

Tesis de Posgrado

Aislamiento, purificación y caracterización de la nucleósido difosfato quinasa del hongo patógeno *Candida albicans* : Comparación con otras especies

Biondi, Ricardo M.

1996

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Biondi, Ricardo M.. (1996). Aislamiento, purificación y caracterización de la nucleósido difosfato quinasa del hongo patógeno *Candida albicans* : Comparación con otras especies. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2812_Biondi.pdf

Cita tipo Chicago:

Biondi, Ricardo M.. "Aislamiento, purificación y caracterización de la nucleósido difosfato quinasa del hongo patógeno *Candida albicans* : Comparación con otras especies". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1996.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2812_Biondi.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

**Aislamiento, Purificación y Caracterización
de la Nucleósido Difosfato Quinasa del
Hongo Patógeno *Candida albicans***

Comparación con otras especies

Autor: Ricardo M. BIONDI

Directora: Dra. María Susana DI BERNARDO de
PASSERON

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires

Departamento de Ciencias Biológicas,
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires

Buenos Aires, Abril 1996

**Isolation, Purification and Characterization of
the Nucleoside Diphosphate Kinase from the
Pathogenic Fungus *Candida albicans***
Comparison with the enzyme from other species

Author: Ricardo M. BIONDI

Thesis Director: Dr. María Susana DI BERNARDO DE
PASSERON

Keywords: Nucleoside diphosphate kinase; *Candida albicans*;
serine phosphorylation; histidine phosphorylation; CK2
substrate; autophosphorylation;

Palabras Claves: Nucleosido difosfato quinasa; *Candida*
albicans; fosforilación en serina; fosforilación en histidina;
sustrato de CK2; autofosforilación;

Summary

Nucleoside diphosphate kinase (NDP kinase) is a ubiquitous enzyme catalysing the synthesis of NTPs from its corresponding NDPs using a NTP donor (physiologically ATP). The reaction follows a ping-pong mechanism of catalysis with a (P)NDP kinase high energy intermediate. Apart of its essential role in the synthesis of NTPs, this enzyme has been related to a) G-protein interaction in signal transduction, b) differentiation in *Drosophila* and different cell lines, c) inhibition of metastasis (nm23), and has recently been identified to d) a transcription factor.

In the present work, data are presented on the purification of *Candida albicans* NDP kinase as well as a biochemical characterization of the enzyme, number and type of subunits, pI, thermal stability and the possibility to use as substrates different NTPs and NDPs. By two different approaches, guanine and adenine di and triphosphates were found to be the better acceptors and donors of the reaction (*Arch. Biochem. Biophys.* (1995), 187-194). The ability of NDP kinase to phosphorylate different anti-HIV nucleotide analogs was addressed, and a methodology was developed to measure the enzyme activity with these substrates (*J. Biol. Chem.* (1996), 271, in press). The specific activity of the enzyme during the growth and morphogenesis of *C. albicans* was studied; the specific activity was found to be maximal during logarithmic growth (*An. Asoc. Quím. Argent.* (1993), 81, 4-5, 359-366). Using purified enzyme, a detailed study of the pure enzyme autophosphorylation was carried out; the results indicated that only histidine autophosphorylation was found. Autophosphorylation in *C. albicans* and *Escherichia coli* crude extracts was also performed. As NDP kinase autophosphorylates in a histidine residue as part of its kinetic mechanism of action, the studies of phosphorylation by other kinases need to discriminate between phosphorylation on serine/threonine and histidine residues. A method on Immobilon membranes using 5% methanol in buffers of pH 1 and 14 is described. This method was used to study the *in vivo* phosphorylation of the enzyme in *C. albicans* and in HeLa cells in culture. Possible implications of *in vivo* NDP kinase serine phosphorylation are discussed.

Resumen

La enzima nucleósido difosfato quinasa (NDP quinasa) es ubicua y cataliza la síntesis de NTPs a partir de sus correspondientes NDPs y un NTP dador (fisiológicamente el ATP). La reacción sigue una cinética de ping-pong con la formación del intermediario de alta energía (P)NDP quinasa. Aparte de su rol fundamental en la síntesis de NTPs, se ha relacionado a esta enzima con a) la activación de proteínas G en la transducción de señales, b) la diferenciación de *Drosophila* y distintas líneas celulares, c) inhibición de metástasis (nm23), y recientemente ha sido identificada como d) un factor de transcripción.

En el presente trabajo se presentan resultados de la purificación y caracterización de la NDP quinasa de *Candida albicans*, un hongo patógeno oportunista de vertebrados. Se caracterizó la enzima bioquímicamente, en cuanto a su tamaño, al número de subunidades, su punto isoelectrico, su estabilidad térmica, y la posibilidad de usar distintos NTPs y NDPs como dadores y aceptores de la reacción. A través de dos enfoques experimentales diferentes se demostró que los nucleótidos de guanina y adenina son los mejores aceptores de la reacción (*Arch. Biochem. Biophys.* (1995),

187-194). Se evaluó a su vez, la capacidad de NDP quinasas de distinto origen de fosforilar a análogos de nucleótidos utilizados en terapias antivirales; para ello, se desarrolló la metodología para medir la actividad NDP quinasa con estos sustratos (J. Biol. Chem. (1996), 271, en prensa). Se estudió la actividad y la presencia de la enzima durante el crecimiento y la morfogénesis del hongo; la actividad específica máxima se encontró durante el crecimiento logarítmico (*An. Asoc. Quím. Argent.* (1993), 81, 4-5, 359-366). Se realizó un estudio detallado del proceso de autofosforilación de la NDP quinasa, y se encontró que sólo se encuentra autofosforilada en residuos de histidina. La autofosforilación de la enzima también se realizó en extractos crudos de *C. albicans* y de *Escherichia coli*. Dado que la NDP quinasa se autofosforila en residuos de histidina como parte de su mecanismo de acción, los ensayos para estudiar la posible regulación de la enzima por fosforilación a través de alguna quinasa necesitan de una metodología que pueda distinguir la fosforilación en histidina de aquella en serina o treonina. Se desarrolló entonces una metodología sobre membranas de Immobilon con el uso de buffers de pH 1 y 14 con el agregado de 5% metanol. Esta metodología se utilizó para estudiar la fosforilación *in vivo* en *C. albicans* y en células HeLa en cultivo. Se discuten las posibles implicancias de la fosforilación en serina *in vivo*.

A IRIS,
A Toda mi Familia

Agradecimientos

- Agradezco a la Dra. Susana Passeron, por su dedicación en la dirección de la tesis. Por su entusiasmo en la discusión de resultados e ideas. Por brindarme gran libertad para experimentar y crecer. Gracias!
- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por el apoyo económico brindado a través de una beca de iniciación y otra de perfeccionamiento.
- A la Universidad de Buenos Aires (UBA), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEyN) y Facultad de Agronomía, lugares donde se realizó la mayor parte del trabajo que se presenta.
- Al CONICET, UBA, ICGEB (International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, Trieste, Italia), Laboratorio Bristol-Myers Squibb (EEUU), y a un convenio CNRS (Francia) - CONICET, por el apoyo económico brindado a la investigación en el laboratorio.
- Al Dr. Michel Véron, cuya colaboración fue importante para avanzar mas rápidamente en el conocimiento; por anticuerpos, enzimas, viajes, charlas y mucho trabajo fructífero.
- A la Dra. Mirtha Flawiá, quien intercedió para presentarme a la Dra. Susana Passeron como posible becario, por la confianza que me tuvo.
- A la Dra. María Leonor Cantore, quien estuvo dispuesta a ayudar y orientar ante la menor consulta, y a los Dres. Miguel Galvagno y Cristina Paveto, quienes generosamente brindaron sus conocimientos durante el tiempo que compartieron en el laboratorio.
- Quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio; en especial a Pedro Fernández Murray, quien fue un apoyo importante desde el primer minuto hasta el último, por su sabiduría; a Kathy Walz (quien merece un párrafo aparte); a Rocío Castilla, por su sonrisa constante; a Pato Pardo, por su eterna disposición a dar opiniones científicas, siempre válidas; a Noemí, por su simpatía permanente; y a todos en general, a Alicia Zelada, Kathy, Pedro, Rocío, Noemí, María y Susana, por aguantarme hasta el final, lo cual no es poca cosa.
- A mis compañeros de laboratorio en el Pasteur, Heike Dammann, Martin Hilderbrandt, Sebastien Mesnildrey., Miguel van Bemmelen, Christophe Anjard, Anna Karlsson, Olivier Sellam, Julie Bourdais, y por supuesto a Iris, por su cálida recepción.
- A Katherina Walz, con quien compartimos, además de la amistad, algunos meses de estudio de NDP quinasa y fue quien realizó las purificaciones de membrana plasmática que se presentan en este trabajo. A Moira Sauane, quien realizó los cultivos de las células HeLa que aquí presento.
- A Gustavo Pesce, por sus buenos consejos a la distancia, que terminaron en un JBC.
- Al laboratorio de Biología Celular (FCEyN), dirigido por el Dr. Julio Azcurra, donde tuvimos la posibilidad de intercambiar nuestros pocos conocimientos con Jorge y Paratcha.

- A los Dres. Augusto García, Norma Kerber y Norma Pucheu, de la cátedra de Microbiología, en la Facultad de Agronomía, por su disposición para cualquier consulta, y para colaborar e intercambiar conocimientos sobre metodologías y sobre un tema en común: la fosforilación.
- A Ioan Lascu, por ideas y apoyo para realizar los experimentos de inhibición con cibacron-blue.
- A Matthias Engel, por apoyar fuertemente nuestra iniciativa de continuar sus estudios sobre fosforilación de la NDP quinasa y con quien colaboramos a la distancia de una manera muy eficiente.
- Al Profesor Issinger por su generosidad en momentos de prestar CK2 recombinante, sin la cual, poco podríamos haber realizado en esa dirección.
- A mis otros maestros en distintas etapas de mi aprendizaje: Dra. Stella Campo y Dr. Lino Barañao, en la dirección de mi Seminario de licenciatura, por sus enseñanzas.
- Al Dr. Alberto Komblitt, por interesarse y brindarme la oportunidad de estudiar la posible unión de NDP quinasa al promotor de la fibronectina; y por sus referencias ...
- A la Dra. Mirta Biscoglio, por su disposición a colaborar en la obtención de la secuencia de la NDP quinasa.
- Al Dr. Armando Parodi, quien estuvo siempre dispuesto a colaborar ante cualquier consulta y pedido.
- A la Dra. Lucía Cordich, quien nos acercó suero humano de un paciente con candidosis sistémica, para medir actividad NDP quinasa.
- Al INGEBI, al IByME y al Dto. de Química Orgánica (FCEyN), por su disposición constante a prestar equipos en casos de emergencia.
- A esta altura, no me quiero olvidar de agradecer a la Dirección de alumnos y graduados de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, en especial a Guido, quien demostró todos estos años gran eficiencia, una actitud de servicio encomiable y poseer siempre una sonrisa.
- Quiero agradecer a mis compañeros de facultad (biólogos, físicos y geólogos), que también fueron soporte del esfuerzo, de las problemáticas, de las discusiones sobre el futuro, del fútbol, etc. Particularmente (con temor a omisión) a Simón, Pablo C., Phil, Monic, Facu, Tincho, Gusi, Fabi, Pablo H., Pablo D., Christo P., Pablo Sh., Maxi T., Pedro C., Alfonso, el Topo, el Tano, Juan Y., Marcelo C., Pablo V., Peste, Reinald, Willi ... por la amistad sin fronteras.
- Finalmente quiero brindar un agradecimiento muy especial a mi familia, y muy particularmente a mi madre y a mi padre, quienes fueron el verdadero soporte para mi continuidad y fundamentalmente quienes me apoyaron fuertemente para cumplir mi vocación.

• Finalizando, (ahora sí) **DOY GRACIAS**,
por todo lo vivido, todo lo aprendido y
por haber hallado a **IRIS**, el **AMOR de mi VIDA**

INTRODUCCIÓN

	Pág.
1. <u>Introducción a <i>C. albicans</i></u>	1
2. <u>Introducción a la NDP quinasa</u>	4
2.1. NDP quinasa y diferenciación celular	8
2.2. NDP quinasa y metástasis	11
2.3. NDP quinasa y transducción de señales	12
2.4. NDP quinasa como factor de transcripción	14
2.5. NDP quinasa y la Proteína X (HBx) del Virus de la Hepatitis B	15
2.6. Estructura de las NDP quinasas	17
2.7. Regulación de la NDP quinasa	18
3. <u>Objetivos del trabajo</u>	19
4. <u>Presentación del trabajo</u>	20

MATERIALES Y MÉTODOS

1. <u>Crecimiento, mantenimiento y morfogénesis de <i>C. albicans</i></u>	21
1.1. Medios de cultivo para el crecimiento y mantenimiento de <i>C. albicans</i>	21
1.1.1. Cultivo y mantenimiento de la cepa	21
1.1.2. Crecimiento de <i>C. albicans</i>	21
1.1.2.1. Medio descrito por Soll y Bedell	21
1.1.2.2. Medio descrito por Lee	21
1.1.2.3. Medio rico depletado en fosfatos	22
1.1.3. Técnicas para inducción de la morfogénesis	22
1.1.3.1. Morfogénesis inducida por temperatura	22
1.1.3.2. Morfogénesis inducida por pH	23
2. <u>Preparación de extractos de <i>C. albicans</i></u>	23
2.1. Buffer de homogeneización	23
2.2. Inhibidores de proteasas	24
2.3. Inhibidores de fosfatasas	24
2.4. Métodos de ruptura de <i>C. albicans</i>	24
2.4.1. Ruptura con alúmina	24
2.4.2. Ruptura con perlas de vidrio	25
2.4.2.1. En homogeneizador Braun	25
2.4.2.2. En homogeneizador Biospec	25
2.4.2.3. En tubos eppendorf	25

	Pág.
3. <u>Medición de Proteínas totales</u>	26
4. <u>Medición de la actividad enzimática de la NDP quinasa</u>	26
4.1. Medición con enzimas acopladas	27
4.1.1. Con piruvato quinasa (PK) y lactato deshidrogenasa (LDH)	27
4.1.2. Con piruvato quinasa	28
4.2. Medición directa de los productos de reacción	30
4.2.1. Con NDP ^3H ó NDP ^{14}C	31
4.2.2. Con GTP γ ^{32}P	32
5. <u>Separación de nucleótidos en TLC</u>	33
6. <u>Purificación de la NDP quinasa de <i>C. albicans</i></u>	33
6.1. Blue Sepharosa	34
6.2. Q- Sepharosa	34
6.3. Red Sepharosa	34
6.4. Fabricación de la matriz de Blue Sepharosa	35
6.5. Regeneración de las columnas	35
7. <u>Autofosforilación de la NDP quinasa pura</u>	35
7.1. Aislamiento de la fosfo-enzima por tamíz molecular	36
7.2. Estudio de los aceptores de la reacción	37
7.3. Competencia de aceptores	37
8. <u>Autofosforilación de la NDP quinasa en extractos crudos</u>	37
9. <u>Estimación del tamaño molecular de la NDP quinasa nativa</u>	38
9.1. Coeficiente de sedimentación. Gradiente de sacarosa	38
9.2. Radio de Stokes. Tamíz molecular	38
9.3. Cálculos de los parámetros hidrodinámicos	38
10. <u>Estimación del tamaño molecular de las subunidades de la NDP quinasa</u>	38
10.1. Geles de Poliacrilamida con SDS	39
10.2. Transferencia de las proteínas a membranas	39
10.3. Técnica de Western-blot	39
10.3.1. Anticuerpos utilizados	40
11. <u>Secuenciación parcial de la NDP quinasa purificada</u>	40
12. <u>Estimación del Punto Isoeléctrico</u>	40
13. <u>Estabilidad térmica</u>	40
14. <u>Estudios cinéticos</u>	41
14.1. Estimaciones de parámetros cinéticos	41

	Pág.
15. <u>Obtención de fracción nuclear y de membrana plasmática de <i>C. albicans</i></u>	42
15.1. Preparación de protoplastos	42
15.2. Purificación de la fracción nuclear	42
15.3. Purificación de la membrana plasmática	43
15.4. Medición de las enzimas marcadoras	43
16. <u>Discriminación entre fosforilaciones en Serina y en Histidina</u>	43
16.1. Metodologías descriptas	43
16.1.1. Fijación ácida, tinción y destinción de geles	44
16.1.2. Estabilidad de las fosfoproteínas sobre Immobilon	44
16.1.3. Metodología mejorada para discriminar Ser-P de His-P en NDP quinasas sobre membranas de Immobilon	44
16.2. Estabilidad a distintos pHs de la NDP quinasa-P en solución	45
17. <u>Fosforilación de NDP quinasas de distinto origen por CK2</u>	45
18. <u>Hidrólisis ácida de la NDP quinasa-P</u>	46
18.1. Separación de los productos de hidrólisis	47
18.2. Reconocimiento de los estándares de fosfo-amino ácidos	47
19. <u>Fosforilación <i>in vivo</i> de la NDP quinasa de <i>C. albicans</i> y de células HeLa</u>	47
19.1. Inmunoprecipitación	48
20. Materiales	49

RESULTADOS

1. <u>NDP quinasa durante el Crecimiento y Morfogénesis de <i>C. albicans</i></u>	50
1.1. NDP quinasa durante el crecimiento	50
1.2. NDP quinasa durante la morfogénesis	52
1.3. Integración	54
2. <u>Purificación y Caracterización</u>	55
2.1. Purificación	55
2.2. Caracterización	58
2.2.1. Tamaño de la NDP quinasa nativa de <i>C. albicans</i>	58
2.2.2. Tamaño de las subunidades de NDP quinasa de <i>C. albicans</i>	59
2.2.3. Punto Isoeléctrico de la NDP quinasa purificada de <i>C. albicans</i>	59
2.2.4. Estabilidad térmica de la NDP quinasa purificada de <i>C. albicans</i>	60
2.2.5. Autofosforilación	61
2.2.5.1. Defosforilación por transferencia de fosfato a NDPs	62
2.2.5.2. Competencia de NDPs como aceptores de la reacción	63
2.2.5.3. Competencia de NDPs como aceptores en presencia de cibacron- blue	64

	Pág.
2.2.6. Cinética de NDP quinasa de <i>C. albicans</i> frente a distintos dadores y aceptores de la reacción	65
2.2.6.1. Nucleótidos naturales	66
2.2.6.2. Análogos de nucleótidos	67
2.2.6.3. Variación en la técnica para medición de AZT-DP como aceptor	68
2.2.6.4. Inhibición por NDPs y NTPs	68
2.3. Integración	69
3. <u>Localización intracelular</u>	72
3.1. Membrana plasmática	72
3.2. Fracción nuclear	72
3.3. Fracción soluble	74
3.4. Integración	74
4. <u>Fosforilación de NDP quinasas</u>	75
4.1. Cuantificación de la autofosforilación en serina	76
4.1.1. Metodologías para la discriminación entre His-P y Ser-P	76
4.1.2. Cinética de estabilidad de NDP quinasas autofosforiladas a distintos pHs, en solución	79
4.1.2.1. Efecto del metanol	80
4.1.3. Hidrólisis ácida	80
4.1.4. Integración parcial	81
4.2. Estudio del efecto del Mg^{2+} sobre la autofosforilación	82
4.2.1. Autofosforilación en extractos crudos de <i>C. albicans</i> y <i>E. coli</i>	83
4.2.2. Integración parcial	86
4.3. Estudios de fosforilación de NDP quinasas <i>in vivo</i> y por proteína quinasa CK2	88
4.3.1. Fosforilación de NDP quinasa de <i>C. albicans</i> con proteína quinasa CK2 recombinante humana	88
4.3.2. Cinética de estabilidad de las distintas especies fosforiladas a distintos pHs.	88
4.3.3. Estudio de fosforilación <i>in vivo</i> de las NDP quinasas de <i>C. albicans</i> y humanas	91
4.3.4. Fosforilación <i>in vivo</i> de la NDP quinasa humana	92
4.3.5. Efecto de la fosforilación por CK2 sobre la actividad de la NDP quinasa A humana	94
4.3.6. Integración	96
5. <u>Integración general</u>	100
6. <u>Conclusiones y perspectivas</u>	103
REFERENCIAS	104

INTRODUCCIÓN

1. Introducción a *C. albicans*

Candida albicans es un hongo patógeno oportunista de vertebrados, causante de la micosis de incidencia mundial más común entre los seres humanos: la candidosis.

C. albicans es una especie de hongo perteneciente al Orden-forma Criptococales (Subclase-forma Blastomycetidae, Clase-forma Deuteromycetes; Subdivisión Deuteromycotina). El género *Candida* representa la fase asexual de varios géneros de levaduras pertenecientes a la Clase Ascomycetes pero además, también representa al estadio asexual de levaduras de la Clase Basidiomycetes (Van Rij, 1984).

Es así que *C. albicans* es considerada una levadura imperfecta, ya que se conoce solamente su forma de reproducción asexual, predominantemente por gemación con producción de blastosporas.

Esta enzima es un comensal de los tractos respiratorio y gastro-intestinal, la vagina y, menos frecuentemente de la piel de las personas sanas. La mayoría de los portadores no sufren ningún efecto como consecuencia de la colonización. Un factor importante de la patogenia de *C. albicans* es que este comensal se transforma en infeccioso, provocando candidosis.

La enfermedad causada por este hongo puede presentarse con distintos grados de severidad, existiendo tres tipos básicos de infecciones: superficiales, localmente invasivas y sistémicas. Así, produce infecciones cutáneas, candidosis oral, aftas, candidosis vulvovaginal, etc., que en general se presentan en asociación con otras enfermedades, con desórdenes fisiológicos, obesidad, uso de antibióticos de amplio espectro, y con las terapias esteroideogénicas. A diferencia de las infecciones superficiales o localmente invasivas, la infección sistémica está asociada con pacientes inmunodeprimidos, y en estos casos, la vida del paciente está comprometida. La incidencia de la candidosis sistémica ha aumentado en forma continua y alarmante en los últimos veinte años debido a depresiones del sistema inmune causadas por

tratamientos de quimioterapia, trasplantes, y especialmente al avance del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). La candidosis sistémica es la causante de aproximadamente la tercera parte de las muertes en enfermos de SIDA, de un tercio de los pacientes terminales de leucemia y un tercio de los receptores de trasplantes de médula ósea.

Debido a que el agente etiológico de esta micosis es ubicuo en el medio ambiente, pero aún más, forma parte de la flora microbiana normal, es casi imposible evitar la exposición a este organismo.

C. albicans es un organismo polimórfico, aunque mayormente crece como células levaduriformes o en forma filamentosa (Odds, 1988). El dimorfismo levadura-micelio de esta especie está íntimamente relacionado a la patogenicidad y especialmente a su capacidad invasiva (Odds, 1988; Soll, 1988).

Sin embargo, los parámetros que gobiernan las transiciones dimórficas de *C. albicans* son poco conocidos.

El avance en el conocimiento de *C. albicans* ha sido lento en relación a otras levaduras por la dificultad intrínseca que trae aparejada la diploidía y la falta de un ciclo sexual. De esta manera, las dificultades para la manipulación genética de *C. albicans* han impedido la identificación de los factores que contribuyen a la transición dimórfica y al aislamiento y la identificación de mutaciones que afecten su patogenicidad.

Se han obtenido mutantes morfológicas y se han clonado diversos genes en *C. albicans* con la esperanza de hallar factores ligados a la morfogénesis y a su patogenicidad, aunque con resultados negativos (Gow y col., 1994; Franklyn y Warmington, 1994; Shepherd, 1985; Kirsch y Whitney, 1991).

Sólo recientemente se ha logrado un avance muy importante haciendo uso de la característica de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* de tener un crecimiento dimórfico y así pasar de levaduras a pseudomicelio en medio de cultivo sin nitrógeno (Gimeno y col., 1992). Se transformaron células de *S. cerevisiae* con una biblioteca genómica de *C. albicans* y se estudiaron las colonias que produjeron pseudomicelio en

un medio en que normalmente crecerían en forma levaduriforme. De esta manera, se clonó y caracterizó un factor de transcripción CPH1, homólogo a STE12 que en *S. cerevisiae* es el último paso de la cascada de señalización de MAP quinasas¹. La delección de este gen en *C. albicans* produjo incapacidad de crecer en forma de micelio en medio sólido, capacidad ésta que se restituyó transformado con CPH1. Sin embargo, la ausencia de este gen no afectó la morfogénesis estimulada en medio líquido (Liu y col., 1994).

Los resultados del trabajo que se comenta tienen gran importancia porque prueban la necesidad de una vía de transducción de señales que determina -al menos- la activación de un factor de transcripción como condición para el crecimiento en forma de micelio. Por otro lado, prueban que no existe una sola vía que lleve al crecimiento hifal. De estos estudios se concluye que la morfogénesis en *C. albicans* es un proceso de múltiples vías con diferentes inductores, y por lo tanto habla de un proceso sumamente complejo y muy importante para la célula.

Entre otros laboratorios, en el nuestro, se ha demostrado que el AMP cíclico juega un papel importante en la transición levadura-micelio (Egidy y col., 1989; 1990). Condiciones de cultivo que mantienen un nivel elevado del nucleótido cíclico estimulan la germinación de células levaduriformes. También se demostró que el hongo posee una adenilil ciclasa dependiente de Mg^{2+} y activable por nucleótidos de guanina (Paveto y col., 1990) y por hormonas del hospedador tales como glucagón, hormona luteinizante (LH), y gonadotrofina coriónica humana (hCG) (Paveto y col. 1991). Más recientemente, utilizando anticuerpos específicos y precursores radioactivos, se demostró inequívocamente la presencia de proteínas G de tipo trimérica (Gs estimuladora y Gi inhibitoria) en membranas del hongo (Paveto y col., 1992). La activación de receptores de membrana con glucagón, con el consiguiente aumento de AMPc, traen aparejado un aumento de formación de tubos germinativos (Paveto y col., 1990; Zelada y col., 1996), de lo cual se infiere que esta vía de transducción de señales, interviene activamente en el proceso de morfogénesis en medio líquido. En eucariotas superiores, la vía de transducción de señales del AMPc interviene en procesos de regulación inmediata de actividades enzimáticas, así como también en

¹MAP quinasas, del inglés "mitogen activated proteins kinases"; quinasas de proteínas activadas por mitosis.

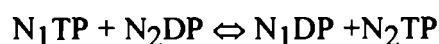
procesos más lentos que transcurren a través de la activación de la transcripción de determinados genes.

Existe un conocimiento profundo de la transducción de señales vía proteínas G. De las proteínas G (monoméricas y triméricas), que en todos los casos son activas cuando se hallan unidas a GTP e inactivas unidas a GDP, uno de los aspectos menos conocidos es el mecanismo por el que se renueva el GTP durante el proceso de activación. Se ha postulado que la enzima nucleósido difosfato quinasa (NDP quinasa) sería la encargada de la transformación del GDP en GTP en las inmediaciones de las proteínas G (Wieland y Jakobs, 1992).

C. albicans aparece como un modelo apropiado para el estudio de los procesos morfogénicos, especialmente desde el punto de vista bioquímico. Sólo recientemente, estudios realizados sobre *S. cerevisiae* han sido aplicados para estudiar el dimorfismo en *C. albicans* con herramientas de biología molecular (Liu y col., 1994).

2. Introducción a la NDP quinasa

La nucleósido difosfato quinasa (NDP quinasa) es una enzima ubicua, que ha sido hallada en todos los sistemas eucarióticos y procarióticos donde se la ha buscado. Desde que fueron descritas por primera vez, independientemente por Berg y Joklik y Krebs y Hems, en 1953, esta enzima ha sido purificada y caracterizada a partir de numerosos organismos (Parks y Agarwal, 1973; Ohtsuki y col., 1984; Koyama y col., 1984; Kimura y Shimada, 1988b; Presecan y col., 1989; Muñoz-Dorado y col. 1990; Jong y Ma, 1991; Kavanaugh-Black y col., 1994; Ulloa y col., 1995). La NDP quinasa cataliza la transferencia del fosfato terminal de un NTP a un NDP con poca especificidad de base y fuerte actividad, de acuerdo a la siguiente reacción química:



donde N_1TP y N_2DP pueden ser ribo o deoxi-nucleótidos di y tri-fosfatos (Parks y Agarwal, 1973).

El mecanismo de la reacción química es del tipo “ping-pong”, e involucra una fosforilación transitoria de la NDP quinasa en un residuo de histidina específico, formando un intermediario de alta energía. El grupo fosfato es luego transferido al NDP aceptor.

Se supone que fisiológicamente el ATP debe ser el N_1TP universal, ya que la síntesis de este nucleótido se realiza fundamentalmente a través de las rutas de fosforilación oxidativa, glucólisis, y otras menores. En contraposición al ATP, las rutas de síntesis de los demás NTPs involucran a la NDP quinasa; como se observa en el esquema de la **figura I-1.**, diversas enzimas intervienen en la síntesis de los distintos NDPs, pero todas convergen en la NDP quinasa para la síntesis de los correspondientes NTPs.

El último trabajo de revisión sobre la NDP quinasa ha sido publicado en 1973 (Parks y Agarwal). En él, los autores deslizan la idea que esta enzima debería tener algún otro rol aparte de mantener el “pool” de NTPs, probablemente un rol regulatorio. Según los autores, la actividad NDP quinasa intracelular es 10 veces mayor a la necesaria para la función de síntesis de NTPs.

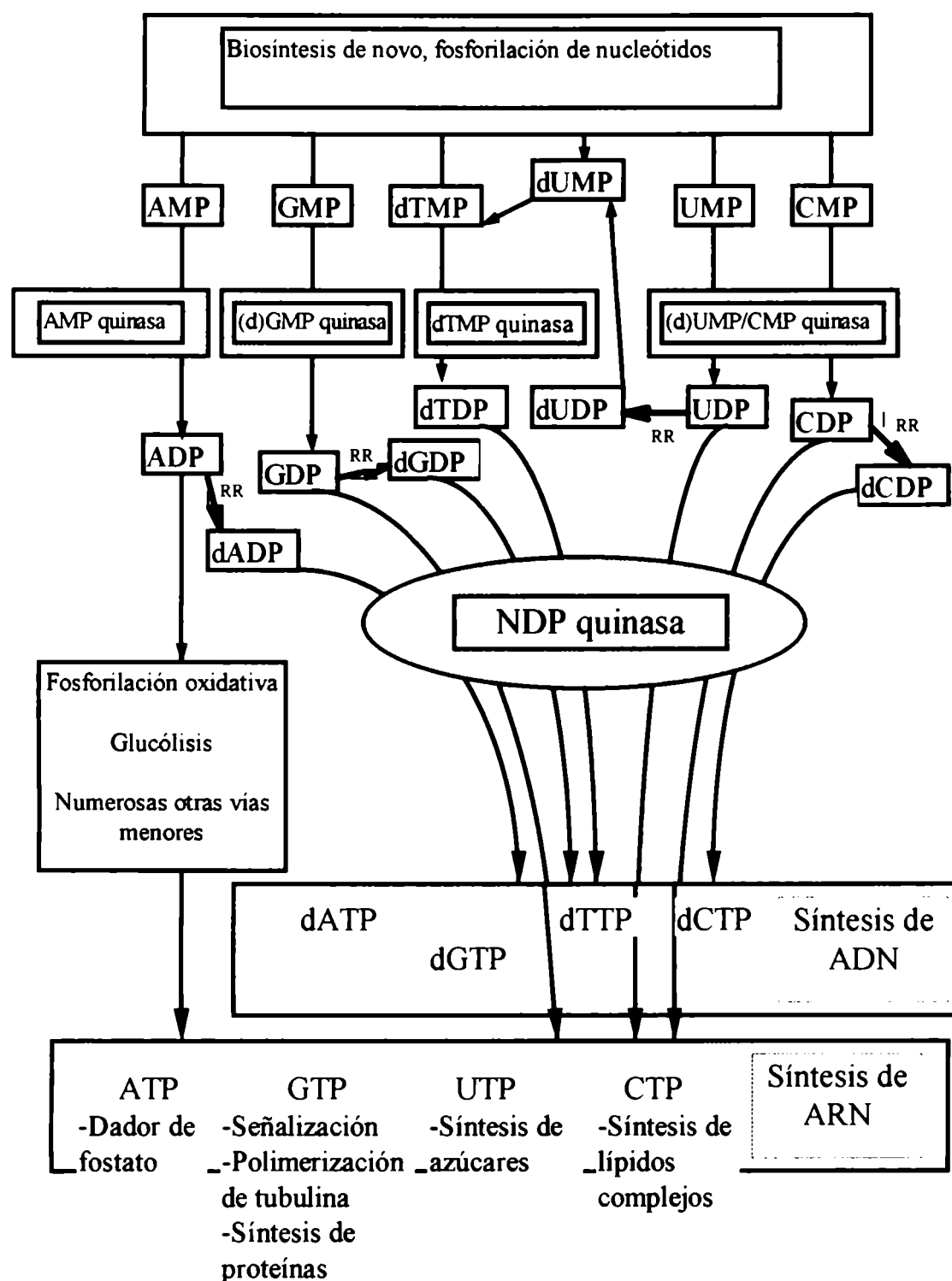


Figura I-1. Síntesis de NTPs. Rol de la NDP quinasa. RR, ribonucleótido reductasa.

En una visión histórica de lo publicado sobre NDP quinasas se observa que el número de publicaciones aumentó de manera muy importante desde el año 1990 (**figura I-2.**). En ese año, se describió que un gen de *Drosophila* conocido como *awd*, cuya mutación produce un desarrollo anormal de la larva y otro gen humano, *nm23*, clonado como inhibidor de metástasis, eran muy homólogos a la NDP quinasa clonada del acrasial *Dictyostelium discoideum* (Wallet y col., 1990). Posteriormente se determinó que efectivamente codificaban para NDP quinasas (Biggs y col., 1990; Gilles y col., 1991).

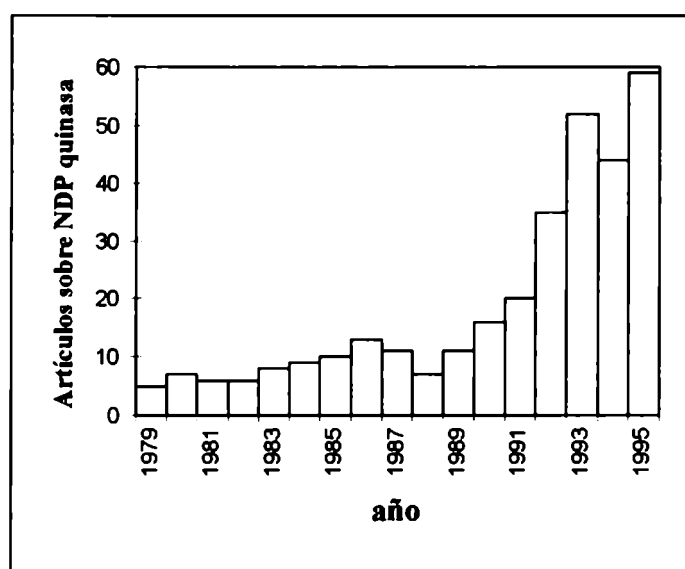


Figura I-2. Visión histórica de lo publicado sobre NDP quinasas.

Más recientemente, investigadores que trabajaban en el factor de transcripción “PuF”², que se une a una región reguladora específica del proto-oncogen *c-myc*, clonaron el factor y hallaron que también se trataba de una NDP quinasa humana (Postel y col., 1993).

Al día de hoy, no se sabe cómo es que la NDP quinasa cumple estas funciones regulatorias que recientemente le han sido asignadas. A continuación se detallan los conocimientos sobre las distintas áreas que podrían arrojar luz sobre la totalidad de las funciones de la NDP quinasa y sobre su mecanismo de acción.

²PuF, sigla del inglés “Purine-binding transcription Factor”, factor de transcripción descrito por su unión a la secuencia GGGTGGG en la zona promotora del gen *c-myc*.

Se ha descrito la existencia de isoenzimas en diversos organismos. Así, en *Dictyostelium* se han encontrado 2 genes. Uno de ellos codifica para una NDP quinasa de origen mitocondrial, que se encuentra codificado en el genoma nuclear y posee un péptido señal para su importación, que es clivado en el interior de la organela. El otro gen descrito en *Dictyostelium* sería codificante de una única proteína citosólica (Troll y col., 1993).

En los restantes organismos eucariontes inferiores no se ha caracterizado una proteína mitocondrial (aunque se supone su existencia), pero se ha caracterizado una única NDP quinasa citosólica (Parks y Agarwal, 1973). Una única NDP quinasa también ha sido caracterizada en organismos procariontes (Parks y Agarwal, 1973).

Los eucariontes superiores, por el contrario, tienen al menos 2 isoenzimas citosólicas relativamente homólogas; éstas se han dado en llamar A y B en humanos, α y β en ratones, etc. (aunque la nomenclatura de los genes y sus productos es más compleja y no se ha uniformado aún). En espinaca, se ha caracterizado una tercera NDP quinasa presumiblemente de localización cloroplástica (Zhang y col., 1993).

Las 2 secuencias de NDP quinasas que más difieren entre sí, poseen un 43% de residuos idénticos. Todas las NDP quinasas estudiadas son multiméricas, variando el número de subunidades según que provengan de organismos eucariotas o procariotas, en hexámeros o tetrámeros respectivamente.

2.1. NDP quinasa y diferenciación celular

La relación entre NDP quinasas y la diferenciación celular es muy estrecha. Uno de los pilares que sostienen las posibles funciones regulatorias de las NDP quinasas se basa justamente en los descubrimientos realizados sobre el desarrollo de *D. melanogaster*.

En *Drosophila*, la mutación *K-pn* (del inglés “killer of *prune*” -asesino de *prune*-) es dominante letal condicional, y causa la muerte a individuos homocigotas o hemicigotas para la mutación del color de ojos *prune* (Sturtevant, 1956). Shearn y col.

estudiaron por una técnica de disgénesis híbrida³, las mutaciones que producen cambios morfológicos en los discos imaginales hacia el tercer estadio larval (ya que éstos diferenciarán a “cabeza”, “tórax” y “genitales”), como una manera de encontrar genes específicos que se integren al proceso de desarrollo y diferenciación. Los autores describen que *K-pn* es una mutación en el gen *awd*⁴ (Biggs y col., 1988). La mutación produce la muerte luego del tercer estadio larval. Los discos que darán lugar a las alas son morfológicamente anormales (hecho que le da nombre al gen) y hay muerte celular; entre otras modificaciones respecto de larvas normales, el cerebro y proventrículo en homocigotas de *awd* aparece vacuolado debido a la acumulación de gotas de lípidos (Dearolf y col., 1988 a y b).

En 1990, se identificó que el gen *awd* corresponde a una NDP quinasa de *Drosophila* (Biggs y col., 1990).

La proteína codificada por el gen *awd* que produce las características mencionadas en conjunción con *prune*, posee una mutación puntual respecto de la NDP quinasa salvaje. La mutación *K-pn* resulta en el reemplazo de la prolina 97 por una serina. La proteína mutada es activa; se diferencia en la estabilidad a la temperatura (Lascu y col., 1992) siendo *awd* estable a 50°C pero no a 65°C, como la enzima salvaje. El amino ácido mutado se encuentra en un lazo o “loop” que interviene en el contacto entre monómeros para formar un trímero; este “loop” se ha dado en llamar “*K-pn* loop” (Dumas y col., 1992).

En relación a otra de las funciones adjudicadas a la NDP quinasa (ver ítem 1.2.), se ha descrito que la mutación *K-pn* tiene un efecto supresor de tumores sanguíneos de *Drosophila* producidos por la mutación *Tum-1*; los individuos con la mutación *K-pn* o *prune*, sobreviven (Zinyk y col., 1993).

Una hipótesis no confirmada indicaría que esta mutación provoca una pérdida de especificidad por sus sustratos naturales, actuando sobre un metabolito de la vía metabólica de *prune*, produciendo un tóxico (Timmons y col., 1995).

³Disgénesis híbrida, (“hybrid dysgenesis”) es un síndrome que ocurre en *Drosophila*, en las células germinales de la progenie producto de la unión de machos de la cepa P con hembras de una cepa de laboratorio llamada M. Una característica de este síndrome, es la inducción de mutaciones causadas por la inserción del transposón P. Los genes interrumpidos por el transposón P son luego fácilmente clonados.

⁴*awd*, sigla del inglés “abnormal wing discs”, discos alares anormales.

Hasta la actualidad, no se ha develado porqué la mutación de una NDP quinasa produce anomalías en el proceso de diferenciación de *Drosophila*, ni tampoco qué función cumple la proteína correspondiente al gen *prune* en este proceso.

Otra evidencia sobre la participación de la NDP quinasa en la diferenciación celular proviene de experimentos realizados sobre una línea celular (células leucémicas mieloides M1 de ratón) que puede ser inducida a diferenciar a macrófagos y a granulocitos por dexametasona (Okabe-Kado y col., 1988). Los autores aislaron células M1 resistentes a la diferenciación y comprobaron que el medio condicionado por estas células y sus extractos celulares poseían un factor inhibitorio de la diferenciación. Este factor fue purificado a partir de medio condicionado y luego de secuenciado, se vio que se trataba de la NDP quinasa B humana (Okabe-Kado y col., 1992).

Más recientemente, los autores encontraron que una proteína truncada poseyendo los amino ácidos 1 a 60 era suficiente para ejercer la acción inhibitoria desde el exterior (Okabe-Kado y col., 1995).

También trabajando con sistemas de diferenciación celular en la hematopoyesis, se clonó una tercera forma de NDP quinasa humana por medio de una búsqueda de clones que se expresan preferencialmente en una leucemia crónica mieloide (CML). Esta enfermedad se caracteriza clínicamente por un aumento crónico de células mieloides inmaduras que se arrestan en la diferenciación (Venturelli y col., 1995).

La NDP quinasa clonada, tiene un 65 y 67% de identidad con las NDP quinasas A y B, respectivamente. Cuando la proteína es sobreexpresada en una línea celular precursora mieloide (32Dc13), bloquea la diferenciación a granulocitos inducida por G-CSF⁵ y lleva a la apoptosis (Venturelli y col., 1995). Los autores estudiaron la expresión de esta NDP quinasa durante la diferenciación normal de células CD34⁺ provenientes de voluntarios sanos, y describieron que su expresión es consistente con una función durante las etapas tempranas de la hematopoyesis (la expresión es elevada en el estado indiferenciado, máxima a los 3 días, disminuyendo hasta hacerse casi indetectable al día 16).

⁵G-CSF, sigla del inglés "granulocyte colony-stimulating factor", factor estimulador de formación de colonias de granulocitos

Al igual que para las otras funciones atribuidas a la NDP quinasa, su mecanismo de acción no ha sido dilucidado aún.

2.2. NDP quinasa y metástasis

Inicialmente se clonó el gen nm-23 de ratón por medio de una búsqueda de genes con expresión diferencial entre líneas celulares con diferente potencial metastásico (Steeg y col., 1988). Con una sonda de origen murino se identificó luego al gen humano nm-23 H1, que resultó homólogo al gen *awd* de *Drosophila* (NDP quinasa A) (Rosengard y col., 1989)

En un primer momento se observó una correlación inversa entre la expresión de su ARNm y el fenotipo metastásico (Bevilaqua y col., 1989).

Pero más importante aún, estudios posteriores indicaron que la expresión de nm-23-H1 disminuye marcadamente el fenotipo y su poder metastásico en células MDA-MB-435 de carcinoma mamario humano (Leone y col., 1991; 1994). En estudios más recientes, se determinó que los dos tipos de NDP quinasas descriptas en ratones (nm23-M1 y nm23-M2, NDP quinasas α y β) son capaces de inhibir la metástasis experimental utilizando una línea celular de melanoma de ratón (Baba y col., 1981).

A partir de las primeras descripciones donde se caracteriza a las NDP quinasas como inhibidores de metástasis, numerosos grupos trataron de ver si la expresión de esta proteína, de su mensajero o su actividad podría ser marcador de pronosis entre tumores que llevarían a metástasis y aquellos que no. Los resultados obtenidos son muy diversos y hasta el presente no existe la posibilidad de una generalización. La relación entre NDP quinasa y tumores metastásicos y no metastásicos sería diferente según el tejido de origen del tumor. En un trabajo de revisión reciente, Steeg y col. describen en detalle los resultados obtenidos hasta el año 1995 (De La Rosa y col., 1995)

Estudios recientes realizados en los organismos procariontes *Myxococcus xanthus* y *Escherichia coli* y en humanos, determinaron que la NDP quinasa se

autofosforila en un residuo de serina, además de la histidina del sitio activo (Muñoz-Dorado y col, 1993; Almaula y col., 1995; MacDonald y col., 1993). Además, se halló a las NDP quinasas humanas A y B fosforiladas *in vivo* (MacDonald y col., 1993). Los autores proponen que la fosforilación en serina de la NDP quinasa se correlacionaría con la inhibición de metástasis.

Por otra parte, Engel y col. determinaron *in vitro* que la NDP quinasa puede ser sustrato de la proteína quinasa CK2 (Engel y col., 1994).

Los resultados obtenidos sobre la inhibición de la metástasis por diversos autores, demuestran una indudable participación de la NDP quinasa durante algunos procesos de metástasis. La manera en que la NDP quinasa participaría no ha sido dilucidada aún.

2.3. NDP quinasa y transducción de señales

La relación de las NDP quinasas con la transducción de señales proviene de los nexos existentes entre esta enzima y diversas proteínas que unen GTP. Dentro de estas proteínas, se la ha relacionado con las subunidades α de las proteínas G triméricas así como también con las proteínas monoméricas que unen GTP como las de la familia Ras. Este grupo de proteínas está íntimamente relacionado a la transducción de señales. Por ejemplo, las proteínas G están relacionadas con la transducción de señales vía un receptor de membrana, el cual, al unirse a su “hormona” (primer mensajero), estimula el intercambio de GDP por GTP sobre la subunidad α , activándola; unida a GTP, permite activar diferentes sistemas enzimáticos intracelulares, produciendo diferentes “segundos mensajeros” específicos. Las proteínas de la familia Ras, son más pequeñas que las subunidades α de las proteínas G, pero comparten con las primeras su capacidad de activarse por medio de la unión al GTP y permanecer inactivas mientras unen GDP. Otra diferencia se basa en que las subunidades α poseen actividad GTPasa para detener la actividad, mientras que las proteínas Ras funcionan con

proteínas asociadas, GAP⁶ para activar la actividad GTPasa y GNEF⁷ que cataliza el intercambio de GDP-GTP.

Como evidencias físicas de la relación de la NDP quinasa con las proteínas G en el proceso de transducción de señales, se ha demostrado que la NDP quinasa co-purifica y co-inmunoprecipita con proteínas G triméricas y monoméricas (Ohtsuki y col., 1986; 1987; Kimura y Shimada, 1988a); la unión resultó ser dependiente del tratamiento previo de las membranas con agonistas como glucagon (en membranas de hígado) o intermediarios no hidrolizables de la señalización (Gpp(NH)p⁸), resultando que la unión no es permanente, y es regulada por hormonas (Kimura y Shimada, 1988a). Bioquímicamente, se encontró que la capacidad de la NDP quinasa de utilizar diferentes NDPs se ve modificada cuando se encuentra en presencia de proteínas G triméricas y monoméricas, aumentando la preferencia por la utilización de GDP como sustrato (con la consiguiente formación de GTP) (Ohtsuki y col., 1987).

En cuanto a la localización de la NDP quinasa, Kimura y Johnson encontraron que un determinado tratamiento de células en cultivo, que produce aumento en la actividad de la adenilil ciclasa, se correlaciona con un significativo cambio en la actividad NDP quinasa en la membrana plasmática (Kimura y Johnson, 1983).

Si bien los reportes en que se demostraba que la NDP quinasa era capaz de fosforilar al GDP mientras permanecía unido a proteínas Ras fueron corregidos por los mismos autores (Randazzo y col., 1991; 1992; Kikkawa y col., 1990; 1990), se ha comprobado que la NDP quinasa “canaliza” el GTP hacia proteínas G de manera tal que el GTP producido por la NDP quinasa es 10 veces más efectivo que el agregado a la solución (Wieland y Jakobs, 1992).

En apoyo de un rol regulatorio de la NDP quinasa en relación con la transducción de señales y proteínas G, se demostró en *Dictyostelium* que la acción de un agonista sobre su receptor transmembrana activa a la NDP quinasa, produciendo GTP, que a su vez activa a la proteína G (Bominaar y col., 1993).

Los resultados obtenidos estudiando en levadura la cinética del intercambio de nucleótidos sobre la proteína Ras y su relación con GNEF, llevaron a concluir que

⁶GAP, sigla del inglés “GTPase activating protein”, proteína que activa la actividad GTPasa de proteínas G monoméricas.

⁷GNEF, sigla del inglés “guanine nucleotide exchange factor”, factor que estimula el intercambio de nucleótidos de guanina sobre proteínas G monoméricas.

⁸Gpp(NH)p, guanosina 5'-(β,γ-imino)trifosfato

GNEF activa el intercambio del di y trifosfato con constantes muy similares, con lo cual la concentración de GTP/GDP en el entorno sería la responsable de la activación o no de Ras. Los autores proponen que la activación (y consiguientemente la regulación) podría estar a cargo de la NDP quinasa (Haney y Broach, 1994).

2.4. NDP quinasa como factor de transcripción

Se han caracterizado alrededor de 12 proteínas que unen ADN en la zona regulatoria del gen *c-myc*; sin embargo, sólo el factor PuF ha sido capaz de regular la transcripción del gen *in vitro*. PuF se describió por primera vez como la fracción de un extracto nuclear de células HeLa parcialmente purificado, que eluye de una columna de DEAE con 0,4 M ClK a pH 7,9 (Postel y col., 1989).

Al clonar y secuenciar el factor PuF se halló que se correspondía exactamente con la NDP quinasa B humana (Postel y col., 1993). En experimentos posteriores, estos autores determinaron que la actividad NDP quinasa era prescindible para observar la unión a ADN y la activación de la transcripción *in vitro* (Postel y col., 1994).

El sitio de unión de la NDP quinasa B es entre la posición -142 y -115, en la zona regulatoria del *c-myc*, que contiene en tandem la secuencia GGGTGGG. Pese a que se postuló la presencia de una triple hélice (Cooney y col., 1988; Postel y col., 1991), ésta no pudo ser demostrada (E. Postel, comunicación personal). La activación *in vivo* de la transcripción inducida por NDP quinasa B fue observada en células en cultivo por transfección transiente (Berberich y Postel, 1995).

Estudios realizados sobre la regulación del *c-myc* en el linfoma de Burkitt, corroboraron esta función descrita para la NDP quinasa B. En esta enfermedad, un alelo del *c-myc* se yuxtapone a sitios cercanos a los loci de las cadenas livianas o pesadas de las inmunoglobulinas. Este alelo translocado se expresa fuertemente mientras que el otro queda silente. Se encontró que el sitio PuF se encuentra ocupado

(por NDP quinasa B) sólo en el alelo translocado (Ji y col., 1995). Este sitio se encuentra protegido también en células HL60 en activa división, mientras que no lo está en células HL60 ya diferenciadas, donde ya no se expresa *c-myc* (Arcinas y Boxer, 1994).

En estudios de unión NDP quinasa B a ácidos nucleicos, se encontró que la unión de la enzima no es específica de secuencia, ni de ADN. Se halló que la enzima tiene preferencia por las cadenas simples pirimidínicas de ADN y ARN (Hilderbrandt y col., 1995).

Hasta el momento, no se hallado una relación entre los efectos de las NDP quinasas en la inhibición de la metástasis como tampoco entre la propiedad de la NDP quinasa B de regular la expresión del *c-myc* y su nexa con la diferenciación. No se sabe si formarían parte de una misma vía o serían caminos de regulación diferentes.

Resulta llamativo que sólo la NDP quinasa B se una a ADN y ARN, y que esta capacidad no la posea la NDP quinasa A. Esta diferencia se podría deber intrínsecamente a los caminos de regulación; sin embargo, no puede descartarse que la NDP quinasa A tenga esta propiedad bajo diferentes condiciones de ensayo. Tampoco se sabe todavía si la capacidad de unir ácidos nucleicos está dada por la característica básica de la NDP quinasa B en contraposición al pI más ácido de la NDP quinasa A.

2.5. NDP quinasa y la Proteína X (HBx) del Virus de la Hepatitis B

El virus de la hepatitis B (VHB) es un miembro de los hepadnavirus que causa fundamentalmente hepatitis de tipo aguda; sin embargo 5-10% de las infecciones progresan a una etapa crónica, que se asocia con cirrosis hepática y eventualmente cáncer de hígado (Nassal y Schaller, 1993).

El genoma del VHB es muy compacto y posee sólo cuatro sitios de inicio de lectura (ORFs, del inglés “open reading frames”). Cada nucleótido tiene función codificante y más del 50% participa en al menos dos ORFs. El genoma viral codifica para una proteína del centro “core” (HBc), una ADN polimerasa (P), un antígeno de superficie (HBs) y la proteína X (HBx). La proteína X tiene 154 amino ácidos y un PM

de 16200, es un activador transcripcional de muchos genes reguladores celulares y virales (Nassal y Schaller, 1993) y en experimentos con animales transgénicos se ha mostrado que induce el cáncer de hígado (Nassal y col., 1993; Koike y col., 1994). Se ha comprobado que la proteína X estimula vías de segundos mensajeros promotoras de tumores a través de aumentos de diacilglicerol, translocación de la proteína quinasa C a la membrana y estimulando la actividad del factor de transcripción AP-1 (formado por el dímero de los proto-oncogenes jun y fos), lo cual podría así explicar la capacidad oncogénica que posee (Kekulé y col., 1993). El gen que codifica para la proteína X está ausente en el virus equivalente de las aves, el cual se diferencia del VHB en que no produce cáncer de hígado.

Recientemente De-Medina y Shaul han descripto que la proteína X posee hasta un 24% de identidad y hasta 38% de similitud con el grupo de NDP quinasas (De-Medina y Shaul, 1994). De acuerdo a la estructura secundaria que se predice, la proteína X poseería una disposición muy similar de las hojas plegadas β , carece de una zona correspondiente al "K-pn loop" (ver la sección correspondiente a la estructura de la NDP quinasa, ítem I-2.6.) y posee una extensión hacia el C terminal. Las estructuras α hélice predichas están casi ausentes salvo en una región C terminal; sumadas a estas diferencias, la proteína X posee 9 cisteínas, formando 4 puentes disulfuro (Gupta y col., 1995). Los autores caracterizaron la capacidad de esta proteína de hidrolizar ATP (De-Medina y col., 1994), de autofosforilarse, y de ceder el fosfato a un NDP aceptor, GDP (De-Medina y Shaul., 1994). Según los autores, su capacidad de catalizar la reacción es muy limitada y por ello sugieren que se trata de una proteína que ha evolucionado a partir del grupo de las NDP quinasas, pero que ha adquirido posteriormente otras capacidades regulatorias. Sin embargo, no se puede descartar que las condiciones utilizadas para medir la actividad no hayan sido las apropiadas.

La relación de la proteína X con las NDP quinasas celulares se ve fortalecida por uno de los mecanismos de acción postulados para ejercer su acción, a través de la activación de proteínas Ras aumentando la formación del complejo Ras-GTP (Benn y Schneider, 1994).

2.6. Estructura de las NDP quinasas

Ya en el año 1963, Ratliff y col. lograron cristales de NDP quinasa de levadura (Ratliff y col., 1963). Por aquel entonces, la cristalografía no era utilizada para la determinación de la estructura espacial de la proteína por difracción de rayos X, sino más bien como un paso de purificación.

La estructura cristalina de la NDP quinasas de *Dictyostelium*, *M. xanthus*, *Drosophila* y humana recombinantes han sido determinadas (Dumas y col., 1991; 1992; Williams y col., 1991; 1993; Chiadmi y col., 1994; Moréra y col., 1995). El sitio activo y su posible mecanismo catalítico han sido estudiados analizando cristales de NDP quinasa-ADP (Williams y col., 1993; Moréra y col., 1994), NDP quinasa-TDP (Cherlifs y col., 1994), NDP quinasa-GDP (Moréra y col., 1995), NDP quinasa autofosforilada (Moréra y col., 1995); algunas predicciones sobre el rol fundamental de determinados residuos han sido confirmadas con el uso de mutantes puntuales (Tepper y col., 1994).

La estructura primaria de las diversas NDP quinasas clonadas no difiere en gran medida. Así, la homología de secuencia entre las NDP quinasas humanas es del 88%. Estudiando de a pares las enzimas eucariotas y procariotas la identidad varía entre 43 y 94% (Hama y col., 1991).

En cuanto a la estructura de la subunidad, ésta es muy similar entre las NDP quinasas cristalizadas. La estructura se basa en un dominio α/β . Tiene una estructura hoja plegada β antiparalela de cuatro cadenas con un orden $\beta_2\beta_3\beta_1\beta_4$. La estructura comienza con los primeros 7 residuos desordenados antes de la β_1 ; luego, hélices α se alternan con hojas β .

Pese a la similitud estructural entre las subunidades de las NDP quinasas cristalizadas, la estructura cuaternaria en *Dictyostelium*, *Drosophila* y humanos está determinada por un hexámero, mientras que la de *M. xanthus* es un tetrámero.

La baja especificidad de las NDP quinasas hacia la base del nucleótido podría explicarse en base a las estructuras cristalinas de las NDP quinasas complejadas a NDPs, dado que no existen uniones puente de hidrógeno directas entre la base nitrogenada y la proteína. Por el contrario, existen uniones puente de hidrógeno entre

el OH 3' de la ribosa y los amino ácidos arginina 109 y asparragina 119 (numeración de *Dictyostelium*) ; la importancia de estos amino ácidos sobre la actividad enzimática ha sido demostrada por mutagénesis dirigida (Tepper y col., 1994).

Diversos análogos de nucleótidos que se utilizan en terapias antivirales no poseen el OH 3' (ddI, dideoxi-inosina; ddC, dideoxi-citidina; AZT⁹, 3'azido-timidina). Sin embargo, todos ellos deben ser fosforilados intracelularmente para formar sus respectivos trifosfatos, los cuales actúan finalmente como inhibidores de enzimas virales. De acuerdo a los modelos actuales, la enzima responsable de la última etapa de la reacción sería la NDP quinasa celular (De Clercq, 1993).

2.7. Regulación de la NDP quinasa

No se ha descrito ningún tipo de regulación para la enzima mas que por la acción de sus sustratos. Sin embargo, recientemente Engel y col. (1994), describieron que la proteína quinasa CK2 (CK2) tiene la capacidad de fosforilar a diversas NDP quinasas *in vitro*. Si bien las NDP quinasas no contienen una región con la secuencia amino acídica consenso para ser fosforilada por CK2 (que implica entre otros requisitos, estar rodeada de residuos ácidos) ésta podría estar dada por la estructura terciaria de la proteína.

La proteína quinasa CK2 es una proteína ubicua encontrada en todos los organismos eucariotas en que se la ha buscado (Pinna, 1990). Esta quinasa forma un tetramero de subunidades α , α' y β (en algunos organismos se ha caracterizado otra subunidad β') donde las subunidades α y α' poseen actividad catalítica. Esta quinasa no responde a los segundos mensajeros estudiados y su regulación es poco conocida. Numerosos sustratos regulados por la CK2 son proteínas nucleares que cumplen funciones en la replicación y en la transcripción de ADN, mientras que otros sustratos tienen relación con la síntesis de proteínas y transducción de señales. La proteína quinasa CK2 es abundante en células en continua división y se han descrito aumentos transientes de actividad luego de la exposición de células a agentes mitogénicos. Para

⁹AZT, 3'-azido timidina, también llamado azido zivudina

una revisión sobre el tema se pueden consultar los trabajos de Pinna (1990) y Allende y Allende (1995).

3. Objetivos del trabajo

En base a los indicios de la función importante que cumpliría la NDP quinasa en el proceso de transducción de señales para actuar sobre la diferenciación celular y metástasis en modelos de organismos eucariontes superiores, se decidió estudiar esta enzima en *C. albicans*, donde el laboratorio ya había descrito los distintos componentes del sistema de transducción de señales que involucran al AMPcíclico como segundo mensajero y su participación en el proceso de la morfogénesis (ver Introducción).

La presencia de la NDP quinasa en *C. albicans* había sido detectada en experimentos preliminares realizados en nuestro laboratorio por el Dr. P. Fernandez Murray.

El objetivo del trabajo fue el estudio de la NDP quinasa de *C. albicans*, su relación con la morfogénesis y su caracterización bioquímica y molecular.

A raíz de la evolución del conocimiento general de diversas NDP quinasas a través de estos años, se realizó la caracterización de la enzima y se estudió en profundidad la autofosforilación y la fosforilación de la enzima de *C. albicans* y de otras especies; asimismo se estudió la posible regulación de la enzima por fosforilación como mecanismo general en NDP quinasas de distinto origen. Además, en base a las metodologías aprendidas y utilizadas durante la caracterización cinética de la enzima de *C. albicans*, se pudo estudiar la cinética y la capacidad de distintas NDP quinasas de metabolizar análogos de nucleótidos de uso medicinal. Estos últimos ensayos se realizaron durante una breve estadía en el Instituto Pasteur, Paris, a partir de una colaboración entre el Dr. M. Véron y la Dra. S. Passeron auspiciada por un convenio CNRS-CONICET.

4. Presentación del trabajo

Materiales y Métodos

En el presente trabajo, la sección Materiales y Métodos ha sido descripta con gran detalle, especialmente en lo que se refiere a las técnicas que aquí se describen. Así, los lectores interesados tendrán protocolos muy claros para la repetición de ciertas metodologías. Otras técnicas, de uso muy extendido (como por ejemplo la cuantificación de proteínas) no son explicadas en detalle.

Resultados

La sección de Resultados se ha dividido en cuatro sub-secciones para su mejor claridad:

- 1- NDP quinasa durante el crecimiento y morfogénesis de *C. albicans*
- 2- Purificación y caracterización
- 3- Localización intracelular
- 4- Fosforilación de NDP quinasas

Al finalizar cada una de las secciones, se hace un pequeño resumen integrando los resultados hallados en nuestro laboratorio con los trabajos que se han publicado sobre el tema.

En una sección final, llamada de Integración General se realiza una unificación general entre todos los resultados obtenidos y se elabora un modelo de funcionamiento de la NDP quinasa que integra los resultados hallados durante el presente trabajo de investigación (especialmente en cuanto a la fosforilación por CK2), con los demás conocimientos develados por otros grupos de investigadores.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Crecimiento, mantenimiento y morfogénesis de *C. albicans*

1.1. Medios de cultivo para el crecimiento y mantenimiento de *C. albicans*

1.1.1. Cultivo y mantenimiento de la cepa

Durante la realización de este trabajo se utilizó la cepa 1001 de *C. albicans* (ATCC 64385) cedida por el Dr. C. Nombela (Universidad Complutense de Madrid). La cepa 1001 se mantuvo en picos de flauta, repicándose cada 30 días; también se guardaron alícuotas en 50% glicerol a -20°C.

La cepa 1001 de *C. albicans* forma actualmente parte del cepario de la cátedra de Micología (FCEyN-UBA) bajo el número xx.

1.1.2. Crecimiento de *C. albicans*

Las células de *C. albicans* se crecieron bajo la forma levaduriforme a 28-30°C en medios líquidos, ya sea con agitación orbital (200 rpm) en erlenmeyers (manteniendo una relación atmósfera:medio de cultivo de 4:1), o indistintamente, en una plancha de movimiento lateral en frascos de Fernbach con igual relación atmósfera:medio de cultivo.

Para la obtención de mayores cantidades de células (300-400 g), se utilizaron 16-17 l de medio de cultivo en un botellón de 20 l con aireación a presión a través de un vidrio frito cerca del fondo y agitación del medio a través de una barra magnética.

1.1.2.1. Medio descrito por Soll y Bedell

El medio de cultivo descrito por Soll y Bedell (1978) contiene (por litro): 10 g de glucosa, 10 g de bactopectona, 1 g de extracto de levadura, 1 g de $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 1 g PO_4HK_2 , y 2,2 g $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$.

1.1.2.2. Medio descrito por Lee

El medio de cultivo definido descrito por Lee y col. (1975) contiene (por litro): 5 g $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, 0,2 g $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 2,5 g $\text{PO}_4\text{K}_2\text{H}$, 5 g ClNa , 12,5 g glucosa, 0,5 g L-

alanina, L-fenilalanina, L-prolina, L-treonina, 1,3 g L-leucina, 1 g L-lisina, 0,1 g L-metionina. Este medio se utilizó para realizar los experimentos de morfogénesis por pH y para algunos estudios de fosforilación *in vivo*.

1.1.2.3. Medio rico depletado en fosfatos

El medio rico de bajo fosfato se obtuvo de acuerdo al protocolo de Rubin (1973) de la siguiente manera: se preparó un medio de cultivo conteniendo por litro: 10 g extracto de levadura, 20 g de bactopectona, y 10 ml de una solución 1 M de SO_4Mg , luego se agregó 10 ml de una solución concentrada de amoníaco. Luego de 30 minutos, el precipitado de PO_4MgNH_4 se filtró, la solución se autoclavó, y se le agregó glucosa hasta una concentración de 2 g por litro.

1.1.3. Técnicas para inducción de la morfogénesis

Se utilizaron 2 técnicas distintas para el estudio de la morfogénesis de *C. albicans* y su relación con la NDP quinasa. La morfogénesis se indujo por dilución y aumento de la temperatura a 37-39°C, dejando como control un cultivo diluido y mantenido a 30°C ó bien elevando la temperatura de ambos cultivos (37°C) pero a distintos pHs. En ambos casos, hay una única variable entre el cultivo morfogenizado y el que continúa en forma levaduriforme.

1.1.3.1. Morfogénesis inducida por temperatura

La morfogénesis inducida por temperatura se realizó de acuerdo a las descripciones metodológicas de Soll y Bedell (1978). La metodología es sencilla y el porcentaje de morfogénesis que se obtiene siguiendo este protocolo es muy alto. El medio de cultivo que se utiliza es el descrito por Soll y Bedell (1978), (ver M-1.1.2.1.).

Se crece el cultivo hasta la fase estacionaria tardía, y se diluye en medio recién preparado y precalentado a 37-39 °C. La dilución se realiza con el objeto de llevar las células a una concentración de 5×10^6 células/ml (por lo general equivale a una dilución 1:100). Como control, se diluyen células de igual manera pero en un medio a 30 °C.

1.1.3.2. Morfogénesis inducida por pH

La técnica para inducción de la morfogénesis por pH fue descrita por Brummel y Soll (1982). Las células se crecen en medio de Lee a 25°C y se mantienen en fase estacionaria durante 24-48 hs. Se utilizan, entonces, células de fase estacionaria tardía donde el 80-90% de las células son singuletes. Para inducir la morfogénesis, se inocula 1 ml de este cultivo en 10-100 ml de medio de Lee a 37°C y pH 6,5, mientras que como control de crecimiento levaduriforme se inocula 1 ml en 10-100 de medio de Lee precalentado a 37°C y llevado a pH 4,5. Los cultivos se crecen a 37°C con agitación a 200 rpm, y se toman alícuotas a diferentes tiempos. Las muestras se filtran a través de una membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm de poro y se congelan hasta su ruptura con alúmina.

2. Preparación de extractos de *C. albicans*

En todos los casos, se trabajó en frío (4°C). Las células se cosecharon, se lavaron dos veces con agua, y una tercera vez con un pequeño volumen de buffer de homogeneización con inhibidores de proteasas (con el agregado de inhibidores de fosfatasa en los casos que se estudió fosforilación *in vivo*).

La cosecha de las células levaduriformes se realizó por centrifugación del cultivo a 3000-5000 rpm en centrífuga refrigerada. La cosecha de las células con tubos germinativos no puede realizarse de esta manera ya que no forman un "pellet" compacto. En estos casos, los cultivos, tanto controles como morfogenizados, se filtraron por membranas de nitrocelulosa de 0,45 µm de tamaño de poro. Las células se trataron luego de acuerdo a la metodología elegida para su ruptura, de acuerdo al ítem M-2.4.

2.1. Buffer de Homogeneización

El buffer de homogeneización fue Tris-ClH 40 mM, pH 7,4, EGTA 0,5 mM, y los agregados de inhibidores correspondientes.

2.2. Inhibidores de proteasas

Los inhibidores utilizados en la preparación de extractos crudos fueron PMSF (1 mM) (Sigma, P7626), leupeptina (3 µg/ml) (Sigma, L0649), antipaina (3 µg/ml) (Sigma, A6191).

2.3. Inhibidores de fosfatasas

Como inhibidores de fosfatasas se incluyeron en las soluciones pirofosfato de sodio, (5 mM), fluoruro de sodio (50 mM), vanadato de sodio (100 µM), y ácido okadaico (1 µM) (Sigma O8010).

2.4. Métodos de ruptura de *C. albicans*

Una característica de las células de *C. albicans* es el grosor de su pared celular. Es así, que sólo las técnicas de ruptura más drásticas son utilizadas con éxito. En el presente trabajo se utilizó o bien la ruptura con alúmina (tipo A5, Sigma A2039), o con perlas de vidrio (425-600 µm, Sigma G9268). La metodología con perlas de vidrio en el homogeneizador Braun fue utilizada con buen resultado para la ruptura eficiente y la obtención de cantidades importantes de proteína en los extractos, y se usó para la purificación de la NDP quinasa.

2.4.1. Ruptura con alúmina

Todos los elementos que se utilizan deben estar fríos; el enfriamiento del mortero en la congeladora fue indispensable para mantener baja la temperatura y contrarrestar el calor liberado por la fricción.

Se pesan las células que se desean romper y se agrega igual volumen de alúmina (en ml) como gramos de células se tengan. Se muele con alúmina en un mortero de porcelana hasta que la consistencia del producto sea similar a la de una pasta de dientes. Se agrega luego buffer de homogeneización con inhibidores de proteasas en un volumen dos veces mayor al de alúmina utilizado. Se centrifuga a 3000-5000 rpm durante 5 minutos y se recupera el sobrenadante.

2.4.2. Ruptura con perlas de vidrio

Se utilizaron perlas de vidrio de un diámetro de 0,5 μm promedio. La metodología se basa en una ruptura mecánica de las células al chocar con las perlas de vidrio a gran velocidad. Para evitar el aumento de la temperatura se aplica frío al sistema en distintas formas.

2.4.2.1. En homogeneizador Braun

El homogeneizador Braun tiene un sistema de enfriado con CO_2 , que se aplica cada minuto, durante 10 segundos. Se utilizó sólo cuando la cantidad de células era importante y se deseaba gran recuperación para la realización de purificaciones.

2.4.2.2. En homogeneizador Biospec

Básicamente el "Bead Beater" (Biospec Products, Bartlesville, OK 74005) es una batidora con la característica de poder cubrir completamente los recipientes con hielo (o hielo y sal) para enfriar. Se aplica la agitación durante 30 segundos y se deja enfriar otros tantos. La recuperación de proteínas es similar a la obtenida con el homogeneizador Braun (hasta 10 mg/ml).

2.4.2.3. En tubos eppendorf

Se agregan dos volúmenes de perlas de vidrio por cada volumen de células centrifugadas, más dos volúmenes de buffer de homogeneización con los inhibidores correspondientes. Si bien la ruptura es muy ineficiente, tiene la inigualable ventaja que puede utilizarse con gran seguridad para la ruptura de células que han crecido con fósforo radioactivo. Se utiliza un vórtex con el fin de agitar las perlas a la mayor velocidad posible. Se enfría en hielo la muestra durante 30 segundos cada 30 segundos de ruptura. Se mide la cantidad de proteínas en el sobrenadante de una breve centrifugación en microcentrífuga, y se continúa con la ruptura hasta haber alcanzado los niveles buscados (por lo general más de 30 minutos para obtener 1 mg/ml).

3. Medición de Proteínas totales

El método descrito por Lowry (1951) se utilizó para determinar la proteína total en aquellos casos donde se deseaba calcular actividades específicas de las enzimas. El método de Bradford (1976) se utilizó para determinar la proteína en columnas de purificación.

4. Medición de la actividad enzimática de la NDP quinasa

La actividad enzimática de la NDP quinasa puede medirse por diferentes métodos. La metodología ideal a emplear dependerá de los sustratos a utilizar, de la cantidad de enzima disponible, de la cantidad de ensayos, el costo, el tiempo, la disponibilidad de aparatos y hasta de la cinética específica de cada NDP quinasa.

Las metodologías que utilizan enzimas acopladas, miden en definitiva, la producción de ADP, que aparece como consecuencia del pasaje del fosfato terminal del ATP a un aceptor de la reacción. En ausencia del aceptor, la posible hidrólisis de ATP se resta como blanco de la reacción.

En los dos métodos de medición con enzimas acopladas utilizados durante el trabajo, la enzima piruvato quinasa (PK) es la encargada de convertir al ADP en ATP en presencia de fosfoenolpiruvato (PEP); por lo tanto, la concentración de ATP se mantiene constante durante el ensayo.

Por el contrario, cuando se utilizan las metodologías directas para medir los productos de reacción, las concentraciones del dador de fosfato y de su NDP correspondiente varían a medida que transcurre la reacción. Por lo tanto, en estos casos la linealidad se pierde con el tiempo y la medición debe realizarse a tiempos cortos, que deben verificarse experimentalmente y que dependerán principalmente de la afinidad de los nucleótidos utilizados, como se ve especialmente con la medición de AZT-DP como aceptor de la reacción.

Se considera 1 unidad enzimática a la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μmol de producto por minuto de reacción.

4.1. Medición con enzimas acopladas

Estas técnicas son de gran practicidad y bajo costo en comparación con las técnicas directas; su mayor limitación surge cuando se desea estudiar la cinética con distintos dadores o aceptores. Para la utilización de esta técnica, se precisa que el NDP del NTP utilizado como dador de la reacción sea buen sustrato de la PK, mientras que el aceptor de la reacción no debe ser sustrato o ser muy malo. Normalmente el dador es el ATP y el aceptor es o bien el 8-Br-IDP (Sigma B2887) (no es sustrato de la PK) o el TDP (muy mal sustrato).

Material necesario:

Piruvato quinasa, E.C. 2.7.1.40, (Sigma P1506)

Láctico deshidrogenasa, E.C. 1.1.1.27, (Sigma L2500)

Buffer de reacción 10X:

Tris-ClH 400 mM, pH 7,4

ClK 500 mM

Cl₂Mg 50 mM

Fosfoenolpiruvato (PEP), (Sigma P7252), solución 100 mM

ATP, (Sigma A2383), solución 100 mM

TDP, (Sigma T9375), solución 100 mM

NADH, (Sigma N8129) solución 10 mg/ml

Agua Milli-Q

Baño termostatzado

2,4-Dinitrofenilhidrazina (Sigma D2630), solución 0,1% en ClH 2N

OHNa, 10 N (no necesita ser de grado analítico)

4.1.1. Con Piruvato Quinasa (PK) y Lactato Deshidrogenasa (LDH)

Esta es la técnica clásica para la medición de actividad de NDP quinasa. El piruvato producido por la PK + NADH es convertido en lactato + NAD, observándose la disminución en la absorción del NADH a 340 nm. El espectrofotómetro Gilford Response™ que posee nuestro laboratorio permite tomar 8 medidas por minuto cuando se mide una muestra y hasta 4 por minuto al medir 6 muestras a la vez; permite graficar la curva de disminución de NADH, elegir la parte lineal, para obtener directamente los

valores expresados en Δ de absorbancia por minuto con su correspondiente error estándar. El volumen final de la reacción dependerá del espectrofotómetro utilizado. En nuestro caso, se utilizó un volumen final de 1 ml, el cual permite un mezclado eficiente y rápido previo a la medición.

Protocolo:

Para un ensayo, agregar en una cubeta de vidrio:

100 μ l de buffer de reacción 10X

850 μ l de agua termostatzada

10 μ l de ATP (100 mM)

10 μ l de PEP (100 mM)

10 μ l de NADH (10 mg/ml)

2 μ l PK

2 μ l LDH

Verificar la absorbancia en el espectrofotómetro.

Agregar 5 μ l de NDP quinasa en la dilución adecuada, mezclar inmediatamente y controlar la absorbancia a través del tiempo.

Agregar 10 μ l de TDP (100 mM) y volver a controlar la absorbancia a través del tiempo.

Se restará la diferencia de Abs obtenida con TDP de la parte control sin el aceptor.

Teniendo en cuenta el coeficiente de absorción mM del NADH ($\text{Ca}=6,24$), se obtiene el valor de la actividad específica (Ae) haciendo el siguiente cálculo:

$$Ae = (Abs \times F \times d) / V \times C$$

donde Abs es la absorbancia (por minuto) registrada restada de su control sin TDP, F es la inversa del coeficiente de absorción mM ($1/\text{Ca}$), d es la dilución de la muestra, V es el volumen de muestra en el ensayo (en ml), y C la concentración de proteína de la muestra (en mg/ml).

4.1.2. Con Piruvato Quinasa

El principio de esta metodología es medir la cantidad de piruvato que se produce como consecuencia de la reacción del ADP (proveniente de la hidrólisis del ATP) con el PEP en presencia de PK. Se detiene la reacción con el agregado de DNFB en medio

ácido; ésta reacciona con cetoácidos (entre ellos el ácido pirúvico) formando dinitrofenil hidrazona, que desarrolla color en medio alcalino (Leloir y Goldenberg, 1960). Es necesario, entonces, realizar una curva de calibración con cantidades conocidas de piruvato.

Esta metodología permite medir la actividad NDP quinasa en un volumen de reacción tan pequeño como 100 µl. Dado su carácter de método colorimétrico (da color rojizo), permite verificar la presencia de la enzima y su abundancia relativa sin necesidad de su medición en espectrofotómetro. Por estas razones, la metodología es importante para ahorrar reactivos, para medir actividad enzimática en fracciones de columnas de purificación, como también para la medición correcta de la actividad de una fracción.

Protocolo:

Para un ensayo, agregar en un tubo mantenido en frío:

10 µl de buffer de reacción 10X

1 µl de ATP (100 mM)

1 µl de PEP (100 mM)

0,1 µl PK

2 µl de TDP (100 mM)

81 µl agua

Agregar 5 µl de NDP quinasa en una dilución adecuada, mezclar, e incubar a 30°C durante 15 minutos.

El ensayo control se realiza en forma idéntica, pero en ausencia de TDP.

Para detener la reacción una vez transcurrido los 15 minutos, se agrega:

150 µl de DNFH en 0,1 N ClH

200 µl de OHNa 10 N,

1 ml de metanol o etanol, agitando para mezclar luego de cada agregado.

Leer en espectrofotómetro a 520 nm.

La absorbancia obtenida, luego de ser restada de su control, debe relacionarse con aquella que surja de cantidades conocidas de ácido pirúvico. El cálculo de la actividad expresada en unidades se obtiene realizando el siguiente cálculo:

De la curva de calibración con pirúvico se obtiene un Factor (F)

$F = \mu\text{moles de pirúvico/Absorvancia}$

La Ae (en unidades/mg de proteína) se obtiene:

$$Ae = (Abs \times F \times d) / t \times V \times C$$

donde Abs es la absorbancia registrada restada de su control sin TDP, F es el factor obtenido a partir de la curva de calibración con pirúvico, d es la dilución de la muestra, t es el tiempo de incubación, V es el volumen de muestra en el ensayo (en ml), y C la concentración de proteína de la muestra (en mg/ml).

4.2. Medición directa de los productos de reacción

La reacción enzimática catalizada por la NDP quinasa también puede medirse en forma directa, sin enzimas acopladas, mediante el uso de precursores radioactivos. La medición por estas técnicas es mucho más engorrosa, más costosa y sólo se lleva a cabo cuando las otras técnicas no pueden ser aplicadas. Serán utilizadas, entonces, cuando se quiera estudiar la cinética enzimática de una dada NDP quinasa para distintos dadores de la reacción, cuyos NDPs no sean buenos sustratos de la PK, para ensayar el ADP y GDP como aceptores de la reacción, o para medir análogos de nucleótidos como sustratos de esta enzima.

En cada caso, a medida que transcurre la reacción se toman alícuotas, se separan los productos radioactivos por cromatografía en placa delgada (TLC), y se mide la radioactividad asociada a cada especie radioactiva.

Material necesario:

Cuba para cromatografía en placa delgada

Placas de Polietilenimine-celulosa sobre poliéster con indicador fluorescente de 254 nm (PEI-celulosa, Aldrich, Z12,288-2)

Solución de bicarbonato de amonio 0,4 M

Solución de ClLi (2 M) : ácido fórmico (1:1)

GDP $3,8,^3\text{H}$ (NEN, 9,6 Ci/mmol) ó ADP $3,8,^3\text{H}$ (NEN, 29,3 Ci/mmol) ó ADP $8\text{-}^{14}\text{C}$ (58 mCi/mmol), $\text{GTP}\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ (5000 Ci/mmol).

Buffer de reacción 10X (no requiere ClK , pero no le afecta tampoco):

Tris- ClH 400 mM, pH 7,4

Cl_2Mg 50mM

NDPs en solución (100 mM)

NTPs en solución (100 mM)

Buffer de extracción:

Tris-ClH 20 mM, pH 7,4

Cl₂Mg 0,7 M

4.2.1. Con NDP ³H o NDP ¹⁴C

El siguiente protocolo servirá para realizar la medición de la actividad a varios tiempos, tomando una alícuota adecuada. El volumen que acá se presenta puede duplicarse o modificarse de acuerdo a las condiciones de trabajo (y la precisión de las micropipetas).

Protocolo para 10 tubos de reacción:

10 µl de buffer de reacción 10X

10 µl de NTP dador de la reacción (100 mM)

10 µl de NDP (10 mM)

30 µl de solución con NDP radioactivo

Se pipetea 6 µl en cada tubo eppendorf y se comienza la reacción agregando:

4 µl de NDP quinasa diluida en Tris-ClH 20 mM, pH 7,4- seroalbúmina bovina (BSA) 0,1 mg/ml

Al cabo de 1, 2, y 4 minutos de incubación, se toman 3 µl y se agregan sobre otro tubo eppendorf que lleve 2 µl de solución de detención: NTP (100 mM): NDP (100 mM): ácido fórmico (88%): agua; (2: 2: 1: 25) (v/v); donde los NDPs y NTPs corresponden a los productos radioactivos, es decir, GDP y GTP para el caso de utilizar GDP³H como precursor radioactivo.

Sembrar 4 µl sobre un punto en placas de PEI, y sin dejar secar, someterlo a cromatografía ascendente en ClLi-ácido fórmico para separar NDPs de NTPs. Para obtener blancos, se siembra en placa de PEI volúmenes equivalentes sin enzima, y se tratan de igual manera.

Concluida la cromatografía, secar al aire, cubrir con un film delgado de polivinilo (Rolopack), y ubicar los nucleótidos bajo la luz UV. Recortar las zonas correspondientes a las manchas y colocarlas en viales de vidrio. Agregar 0,5 ml de buffer de extracción y agitar durante al menos 2 horas. Tomar la solución, dejar decantar, y medir la radioactividad de 200 μ l de la solución con el agregado de 2,5 ml de solución centelladora Optiphase “Hi safe” en viales de plástico.

Cuando se trabaja con ^{14}C , existe la posibilidad de medir la radioactividad directamente a partir de la placa de PEI con el uso de un Phosphor-Imager; esta técnica también se aplica cuando se utiliza $\text{GTP}\gamma^{32}\text{P}$ como se verá en el siguiente punto.

Para calcular la Ae de la NDP quinasa por este método, se sigue por lo general la siguiente mecánica. Se suma la radioactividad (o unidades) asociada a GDP y GTP (en el caso de utilizar GDP^3H y se obtiene un promedio de estos datos (Pcpm) para cada serie de experimentos. La actividad se calcula luego:

$(300 \text{ pmol/Pcpm}) \times \text{cpmNTP}^* = \text{pmol NTP}^* \text{ producidos a un determinado tiempo}$
 donde cpmNTP* es la radioactividad asociada al NTP a ese tiempo. El valor 300 pmol proviene de la cantidad de GDP (0,1 mM) en un volumen de 3 μ l. Para obtener la Ae (en unidades/mg de proteína):

$$\text{Ae} = \mu\text{mol GTP} \times d \times 0,3 / t \times V \times C$$

donde d es la dilución de la enzima usada para el ensayo en 10 μ l, t es el tiempo (minutos), V es el volumen de enzima usado (en general 4 μ l), C la concentración de la enzima original (en mg/ml). El valor 0,3 proviene de la proporción de enzima en el volumen de incubación donde se midió la actividad a un determinado tiempo.

4.2.2. Con $\text{GTP}\gamma^{32}\text{P}$

El ensayo utilizando $\text{GTP}\gamma^{32}\text{P}$ es similar al de NDPs radioactivos en cuanto a la preparación de los tubos para la reacción. La radioactividad de los NTPs formados es del orden de la centésima parte de aquella del GTP^* utilizado como dador. Por esta razón, el $\text{GTP}\gamma^{32}\text{P}$ debe ser de muy buena calidad, poseer poco o nada de Pi y nada de contaminantes radioactivos. Otra diferencia con el uso de NDPs radioactivos es que en este ensayo se necesita separar al $\text{GTP}\gamma^{32}\text{P}$ del $\text{NTP}\gamma^{32}\text{P}$ recién formado. Para ésto, se

deben separar los nucleótidos a través de otro sistema de solventes (bicarbonato de amonio). Es por este motivo que la reacción se debe detener de una forma diferente.

Por consiguiente, el protocolo se modifica de la siguiente manera:

Concluido el tiempo programado para la reacción, se toman 3 µl de la reacción, se inactiva la NDP quinasa por incubación a 85°C durante 2 minutos y se agregan 2 µl de una solución de GTP-GDP (10 mM cada uno) luego de dejar enfriar. Se siembran 4 µl en placas de PEI y sin dejar secar, se somete a la cromatografía en 0,4 M bicarbonato de amonio.

Los resultados por esta metodología fueron en todas las ocasiones medidos con Phosphor-Imager y fundamentalmente utilizados para medir la actividad sobre análogos de nucleótidos-difosfatos. Previamente, se debió corroborar cómo separar a los análogos del nucleótido-trifosfato del GTP. Este ensayo fue especialmente diseñado para la realización de las medidas de actividad usando como sustrato AZT-DP.

5. Separación de nucleótidos en TLC

Para la separación de nucleótidos en TLC se utilizaron básicamente dos solventes y un único soporte, PolietileneImine (PEI)-celulosa. La separación de NTPs se obtiene con bicarbonato de amonio como solvente, mientras que para separar un NDP de su correspondiente NTP la separación óptima utilizada se obtuvo con CILi-ácido fórmico.

6. Purificación de la NDP quinasa de *C. albicans*

La purificación a homogeneidad de la NDP quinasa de *C. albicans*, se realizó a través de 3 pasos de purificación: 1- Blue-Sepharosa, 2- Q-Sepharosa y 3- Red Sepharosa. Sin embargo, para la mayor parte de los estudios con proteína purificada, se utilizó enzima proveniente de los dos primeros pasos de purificación, seleccionando las fracciones más puras de la Q-Sepharosa.

En una preparación típica se comenzó con 200 gramos de células (peso húmedo), se realizaron extractos con homogeneizador Braun, y se centrifugaron a 100.000 g durante 1 hora.

6.1. Blue Sepharosa

En 60 ml de columna (2,6 x 11 cm) equilibrada en Tris-ClH 40 mM, EDTA 5 mM, β -mercaptoetanol 1,5 mM, (buffer A), se sembraron hasta 1300 mg de proteína provenientes de un sobrenadante de 100.000 g durante 1 hora. Se lavó la columna hasta que no se midió más proteína en el lavado, y se eluyeron las proteínas unidas débilmente a la columna con buffer A conteniendo 250 mM de ClNa (2 volúmenes de columna); se continuó lavando con buffer A hasta que no se midió proteína en el lavado. A continuación, se eluyó la NDP quinasa con 6 volúmenes de columna de buffer A conteniendo 1,5 mM de ATP. Se juntaron las fracciones con actividad NDP quinasa.

6.2. Q- Sepharosa

Las fracciones con actividad NDP quinasa provenientes del paso de purificación en Blue-Sepharosa, se juntaron y dializaron contra buffer Tris-ClH 40 mM, pH 8, EGTA 0,5 mM, β -mercaptoetanol 1,5 mM (buffer B) con carbón activado, y este “pool” se sembró en una columna de flujo rápido de Q-Sepharosa (Sigma, Q1126) (1 x 4 cm). La columna se lavó con buffer B (2 volúmenes de columna), y luego se eluyeron las proteínas con un gradiente de 30 ml (0-0,3M ClNa). Las fracciones con actividad se juntaron, se concentraron en concentradores Minicon B-15, y el concentrado se dializó y se aplicó en una columna de Red agarosa equilibrada en buffer A.

6.3. Red Sepharosa

El concentrado dializado contra buffer A, proveniente de la Q-Sepharosa, se sembró en una columna de 0,5 ml de Reactive Red 120- agarosa (Sigma, R9126), la columna se lavó con buffer A conteniendo 200 mM de ClK (5 ml), y selectivamente se eluyó la NDP quinasa con el mismo buffer conteniendo 5 mM GDP. Las fracciones con actividad se juntaron, se dializaron contra buffer A con 20% glicerol (v/v) y se guardaron alicuotadas a -20°C.

Posteriormente, la purificación se simplificó aplicando directamente a la Q-Sepharosa la fracción proveniente de la Blue-Sepharosa, y eluyendo de igual manera. Las fracciones con mayor actividad específica y sin contaminantes de otras proteínas se combinaron. De esta manera, se obtiene menor rendimiento, pero se ahorra un paso de purificación.

6.4. Fabricación de la matriz de Blue Sepharosa

Se preparó Blue-Sepharosa según el protocolo proporcionado por el Dr. Ioan Lascu (comunicación personal). El protocolo consiste en diluir 2 gramos de cibacron-blue (Sigma, C9534) en 60 ml de agua y agregar gota a gota de esta solución a una suspensión de 150 ml de Sepharosa CL-6B (Pharmacia) + 150 ml de agua. Calentar a 60 °C durante 30 minutos con agitación. Agregar luego 45 gramos de ClNa y dejar 1 hora a 60°C. Calentar a 80°C, agregar 4 gramos de CO_3Na_2 y dejar con agitación 2 horas a 80°C. Lavar luego con agua (1 l), seguidamente con 0,1 M CO_3Na_2 (1 l), y nuevamente agua (1 l), 0,1 M ácido acético (1 l) y agua hasta que el sobrenadante sea incoloro (Böhme y col., 1972).

Para evaluar la incorporación de colorante a la matriz se preparó un estándar de colorante con cantidades conocidas de cibacron-blue, y se agregó igual volumen de ClH 6 M. Se midió la absorbancia de diferentes cantidades del estándar. Se hidrolizó un volumen de 0,5 ml de Blue-Sepharosa con ClH 6M a 45°C durante 45 minutos, se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos y se midió en espectrofotómetro la cantidad de colorante liberada (Chambers, G.K., 1977).

Dos preparaciones distintas de Blue-Sepharosa dieron una incorporación de 2,8 y 4,3 μmoles de cibacron-blue/ ml de resina.

6.5. Regeneración de las columnas

Las dos columnas con colorantes utilizadas para la purificación se regeneraron liberando las proteínas que quedaban aún unidas lavando extensamente con ClNa 2 M, luego con ClNa 2 M - urea 2 M, y requilibrando en el buffer de corrida. La Q-Sepharosa se puede regenerar lavando con ClNa 2M y requilibrando en el buffer de corrida ó con el tratamiento tradicional para la DEAE.

7. Autofosforilación de la NDP quinasa pura

La autofosforilación de la NDP quinasa pura se realizó a 4°C en un buffer conteniendo 20 mM Tris-ClH pH 7,5, 4 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM Cl_2Mg , y ATP γ [^{32}P] (20 μM , 1,6 mCi/ μmol); la reacción se inició por el agregado de la enzima. Para la cinética de fosforilación, se utilizó 1 μg de NDP quinasa pura y la actividad específica del

ATP[^{32}P] fue de $2,8 \times 10^6$ cpm/nmol en un volumen de 0,1 ml. A los distintos tiempos se tomó una alícuota, se detuvo la reacción con 10 volúmenes de 10 mM EDTA y se filtró por una membrana de nitrocelulosa, se lavó 3 veces con 2 ml de buffer, y se midió la radioactividad retenida en la membrana. Para separar la proteína fosforilada en geles de poliacrilamida, se realizó una incubación idéntica, se agregó solución de Laemmli 2x saturada en urea, se calentó a 70°C durante 2 minutos y se sembró en un gel de poliacrilamida 15 % (SDS-PAGE). Alternativamente, la autofosforilación se realizó como se describe en el ítem M-8. con extractos crudos.

7.1. Aislamiento de la fosfo-enzima por tamiz molecular

La enzima fosforilada de la manera descrita precedentemente se sembró en una columna P2 (Bio-gel P-2 fine, Bio Rad. cat. 150-4114) y se cromatografió usando como solvente 20 mM Tris-ClH, pH 7,5. De las fracciones donde comenzó a eluir la radioactividad (medida con Geiger) se tomaron alícuotas y se sembraron en placas de PEI. Los productos se separaron corriendo luego con cualquiera de los dos tipos de solventes descriptos en el ítem M-5. Se detectó la radioactividad por autorradiografía de la placa. Se eligieron, entonces, las fracciones que conteniendo (P)NDP quinasa no poseían ATP contaminante, como se muestra en la figura M-1.

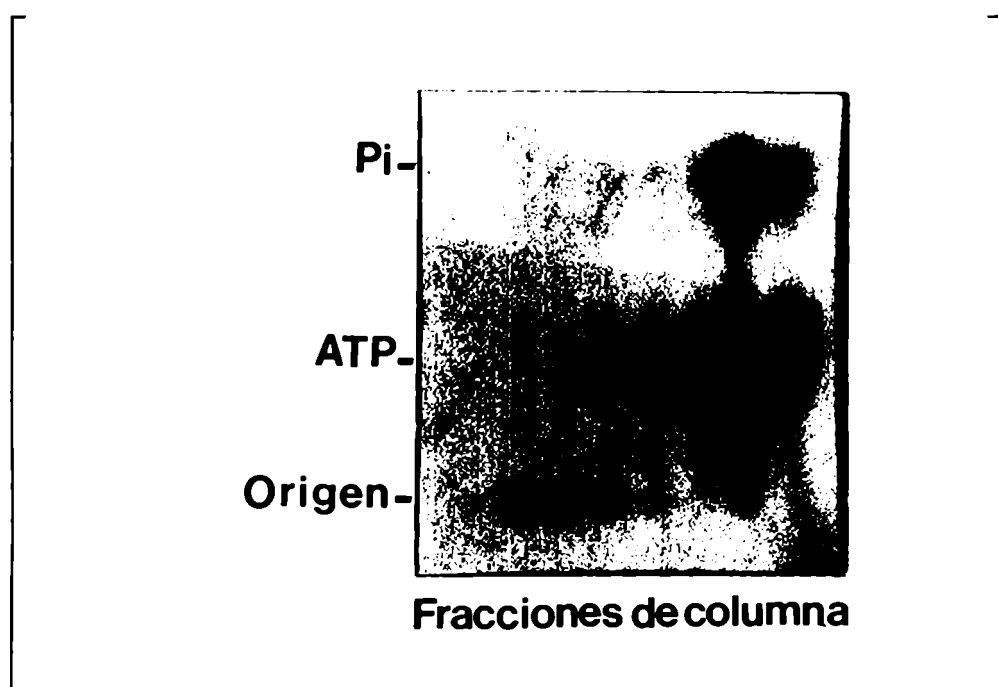


Figura M-1. Separación de (P)NDP quinasa de ATP[$\gamma^{32}\text{P}$] no reaccionante. La enzima autofosforilada se observa en el origen.

7.2. Estudio de los aceptores de la reacción

La enzima purificada autofosforilada, y separada del ATP como se describe en M-7.1, se utilizó para estudiar la capacidad de la (P)NDP quinasa de ceder el fosfato de alta energía a distintos NDPs. Se incubó la (P)NDP quinasa en buffer Tris-ClH 20 mM, 1mM Cl_2Mg y 20 μM de los distintos NDPs a temperatura ambiente durante 5 minutos. Los productos formados se separaron en TLC con 0,4 M bicarbonato de amonio.

7.3. Competencia de aceptores

Para estudiar la posibilidad de que la NDP quinasa tuviese distintos parámetros cinéticos hacia distintos NDPs, se estudió la capacidad de la (P)NDP quinasa de ceder el fosfato de alta energía a una mezcla de NDPs aceptores. Se incubó la fosfoenzima, entonces, como se describe en el ítem M-7.2. durante 5 minutos con una mezcla de GDP + NDPs.

Se estudió también la competencia de aceptores de la reacción preincubando la (P)NDP quinasa con 20 μM cibacron-blue y agregando este colorante en igual concentración durante la incubación con los NDPs. Como control, se estudió la capacidad del cibacron-blue de inhibir en idénticas condiciones la actividad de la enzima.

8. Autofosforilación de la NDP quinasa en extractos crudos

Para la autofosforilación de la NDP quinasa en extractos crudos, se incubó a 4°C entre 1 y 10 μg de extracto con 0,5 mM Cl_2Mg , $\text{ATP}\gamma[^{32}\text{P}]$ (por lo general 50 μM) y 10 mM EDTA en buffer Tris-ClH 40 mM, pH 7,4. Este procedimiento se realizó también con extractos crudos de *E. coli*. Seguidamente se detuvo la reacción con solución de Laemmli 2x saturada con urea, se calentó a 70°C durante 2 minutos, y se sembraron alícuotas de las muestras en geles de poliacrilamida de 15% de poro (SDS-PAGE). Este procedimiento también se realizó con la enzima purificada para estudiar la dependencia del Mg^{2+} de la autofosforilación.

9. Estimación del tamaño molecular de la NDP quinasa nativa

Para determinar el tamaño molecular de la NDP quinasa nativa, se desarrollaron gradientes de sacarosa y tamices moleculares con estándares adecuados. Los estándares utilizados fueron glucosa oxidasa, lactato deshidrogenasa, peroxidasa y citocromo c.

9.1. Coeficiente de sedimentación. Gradiente de sacarosa

Se realizaron gradientes de sacarosa con el objeto de obtener el coeficiente de sedimentación (S). Éste se determinó de acuerdo a Martin y Ames (1961).

9.2. Radio de Stokes. Tamíz molecular

El radio de Stokes de la enzima fue obtenido mediante la filtración en gel en una columna Sephacryl S-200, de acuerdo a Laurent y Killander (1964).

9.3. Cálculos de los parámetros hidrodinámicos

Los cálculos de los parámetros hidrodinámicos se realizaron de acuerdo a Siegel y Monty (1966). Para calcular el PM de la proteína a partir del coeficiente de sedimentación y el radio de Stokes, se realiza el siguiente cálculo:

$$PM = \frac{6 \pi N \eta_{20,w} \times a \times S_{20,w}}{1 - v \rho_{20,w}}$$

Donde N es el número de Avogadro ($6,02 \times 10^{23}$ moléculas/mol), η es la viscosidad del agua ($1,1 \times 10^{-2}$ g/cm seg), v es el volumen específico parcial ($0,74 \text{ cm}^3/\text{g}$), ρ es la densidad del agua ($0,98 \text{ g/cm}^3$), a es el radio de Stokes ($\times 10^{-7} \text{ cm}$), y S el coeficiente de Sedimentación ($\times 10^{-13} \text{ seg}$).

10. Estimación del tamaño molecular de las subunidades de la NDP quinasa

La estimación del tamaño molecular de la subunidad fue estudiada en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE). La curva de estándares de PM se realizó gráficamente según las instrucciones de los proveedores. Los marcadores de PM utilizados durante las diferentes etapas de la tesis fueron Dalton Mark VII, Sigma, y los marcadores preteñidos coloreados Kaleidoscope (Bio Rad).

10.1. Geles de Poliacrilamida con SDS

Las técnicas de electroforesis en geles de poliacrilamida se realizaron siguiendo las indicaciones del libro "Proteins", (Methods in Molecular Biology, Vol. 1, Ed. John M. Walker, Humana Press, Clifton, New Jersey, 1988). Los materiales utilizados fueron de grado de pureza electroforético, Bio Rad: acrilamida (cat 161-0103), bis acrilamida (cat 161-0201), Tris (cat 161-0719), β -mercaptoetanol (cat 161-0710), bromofenol Blue (cat 161-0404) y persulfato de amonio (cat 161-0700).

10.2. Transferencia de las proteínas a membranas

La transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa (0,45 μ m, Protran™ Schleicher & Schuell; 0,2 μ m, Sigma N8017) o Immobilon (Immobilon-P, Millipore), se realizó mediante electrotransferencia ya sea en cubas para transferencia húmeda o semi-seca, en buffer 25 mM Tris, 192 mM Glicina, 20% metanol, pH 8,3 (Towbin y col., 1979).

10.3. Técnica de Western-Blot

La técnica utilizada para la detección de las proteínas de interés sobre las membranas de nitrocelulosa o Immobilon se realizó según el protocolo que se detalla a continuación.

Las membranas se incuban durante 1 hora a 37°C (o toda la noche a 4°C) en PBST-leche (Buffer fosfato, 10 mM, ClNa 0,9 %, con 0,05% Tween 20 y 5% de leche en polvo descremada).

Se incuba a continuación con el anticuerpo específico (hecho en conejo) diluido en PBST ya sea durante 2 horas a 37°C o durante toda la noche a 4°C. A continuación se lava en PBST 4 veces durante 10 minutos cada vez.

El reconocimiento del anticuerpo específico se realiza incubando durante 1 hora a 37°C con el anticuerpo biotinilado (anti-rabbit IgG, whole molecule, Sigma B8895) en una dilución 1/2000.

Se lava nuevamente con la variante que el último lavado se realiza con PBS (sin tween), se incuba con avidina-biotina-peroxidasa según las instrucciones de Vectastain® ABC (Vector lab. Inc., CA 94010, USA) durante 30 minutos. Se lavan las membranas y

se revela usando como sustrato 4-cloro-1 α -naftol. La solución de revelado se prepara con 27 mg de 4-cloro-1 α naftol en 5,7 ml de metanol frío mezclados inmediatamente antes de usar con 28 ml de PBS con el agregado de 71 μ l de H₂O₂ 100 %.

10.3.1. Anticuerpos utilizados

Los anticuerpos utilizados para revelar la presencia de la NDP quinasa fueron aquellos levantados contra la enzima recombinante de *D. discoideum* cedidos por el Dr. Michel Véron y aquellos desarrollados contra la NDP quinasa de *C. albicans* purificada, levantados en nuestro laboratorio por la Lic. Katherina Walz.

11. Secuenciación parcial de la NDP quinasa purificada

La enzima purificada se sometió a una electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante, se transfirió a nitrocelulosa y la banda correspondiente se recortó, se eluyó y se sometió a una digestión triptica. Los fragmentos tripticos se separaron por HPLC y dos péptidos hidrofóbicos elegidos se sembraron sobre Immobilon para ser secuenciados mediante el método de Edman automatizado. Esta metodología fue desarrollada por el servicio de secuenciación del Instituto Pasteur, Paris, en el marco de una colaboración con el Dr. Michel Véron.

12. Estimación del Punto Isoeléctrico

Se estimó el punto isoelectrico de la NDP quinasa nativa en geles de 5% poliacrilamida usando Pharmalite 3-10 para fabricar el gradiente de pH.

13. Estabilidad térmica

Para el estudio de la estabilidad térmica de la NDP quinasa de *C. albicans*, se incubó la enzima en una concentración de 0,01 mg/ml a 4, 37, 50 y 70°C; a los diferentes tiempos se tomó una alícuota, y se mantuvo en hielo hasta que se midió su actividad enzimática por el método espectrofotométrico con 2 enzimas acopladas. Cuando se

realizaron los estudios midiendo la actividad inmediatamente después del tratamiento térmico (sin ser mantenida en hielo), se obtuvieron resultados idénticos.

14. Estudios cinéticos

La cinética de reacción de las NDP quinasas es del tipo de ping-pong. Los parámetros obtenidos en este trabajo corresponden a la constante de Michaelis (K_m) y velocidades máximas ($V_{m\acute{a}x}$) bajo una situación en que se deja fija una de las concentraciones de los sustratos mientras se varían las del otro. Los parámetros así obtenidos son “aparentes”; no son los parámetros “reales”. Sin embargo, los valores de eficiencia (E) que se podrían calcular a partir de estos datos serían “reales” ($E = k_{cat} / K_m$, donde k_{cat} es la constante catalítica -actividad máxima/mol-). Para mayores detalles de la cinética del tipo ping-pong, se puede consultar el libro de Segel (1975).

Con la enzima de *C. albicans*, se estudiaron ADP, GDP, TDP y CDP como aceptores de la reacción, utilizando ATP 1 mM como dador de fosfato (concentración que podría ser la fisiológica). Los estudios variando ADP y GDP se realizaron con los respectivos nucleótidos tritiados (ver ítem M-4.2.1.). Los parámetros obtenidos variando TDP y CDP se realizaron por la metodología con 2 enzimas acopladas, por el método espectrofotométrico (ver ítem M-4.1.1.). Para estudiar los NTPs como dadores de la reacción, se utilizó GDP^3H 0,1 mM como sustrato fijo.

Los estudios con análogos de nucleótidos tri-fosfatos (AZT-TP), se realizaron con $ADP-^{14}C$ 0,1 mM variando las concentraciones del dador. Para los estudios cinéticos con AZT-DP, se utilizó $GTP\gamma^{32}P$ 1 mM como dador de la reacción. Los resultados en ambos casos fueron analizados con un Phosphor-Imager (Molecular Dynamics) y cuantificados utilizando el programa Image Quant. Estos estudios se realizaron con diversas NDP quinasas. Se muestran algunos resultados utilizando la enzima de *C. albicans* y de *D. discoideum*.

14.1. Estimaciones de parámetros cinéticos

Los parámetros K_m y $V_{m\acute{a}x}$ fueron calculados aproximando los datos obtenidos a una hipérbola en el programa Kaleidagraph (para MacIntosh) según la fórmula:

$$y = m_1 \times m_0 / (m_2 + m_0)$$

donde m_1 corresponde a la V_{\max} y m_2 a la K_m . Los datos que se precisan entrar al programa son las velocidades enzimáticas obtenidas (y) a las diferentes concentraciones de sustrato (m_0). Los coeficientes de regresión, R , fueron siempre mayores a 0,95.

15. Obtención de fracción nuclear y de membrana plasmática de *C. albicans*

15.1. Preparación de protoplastos

El protocolo para obtener protoplastos con el objeto de purificar núcleos fue el siguiente. Se utilizaron células provenientes de cultivos logarítmicos. Se preincubaron 5 g de células a 45°C durante 30 minutos en 25 ml de un buffer Tris-ClH 100 mM, pH 8,5 conteniendo 50 mM DTT y 5 mM EDTA. Terminada la preincubación, las células se lavaron con agua y se resuspendieron en 35 ml de buffer Sorbitol (Tris-ClH 50 mM, pH 7,4, 10 mM Cl_2Mg , 1 mM DTT, 1 M sorbitol) con el agregado de 3,3 ml de β -glucuronidasa (Sigma G8885). Las células se incubaron a 30°C y al cabo de 1 hora se verificó si se habían formado los protoplastos. Al tiempo en que los protoplastos se formaron, se lavaron con buffer Sorbitol.

15.2. Purificación de la fracción nuclear

Todos los pasos a seguir para la obtención de núcleos se realizaron a 4°C. Los protoplastos lavados se diluyeron entre 15 y 25 veces en buffer Ficoll, (Tris-ClH 10 mM, pH 7,5, 20 mM ClK, 5 mM Cl_2Mg , 3 mM DTT, 1 mM EDTA, en 18 % (p/v) de Ficoll 400) con inhibidores de proteasas. Los protoplastos explotan pero dejan intactos a los núcleos. El preparado se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos, descartándose el pellet. Los núcleos se aislaron en una segunda centrifugación a 11000 rpm durante 26 minutos. Se resuspendieron y se lavaron en buffer Ficoll (siguiendo el protocolo desarrollado para levaduras descripto en el manual "Current Protocols in Molecular Biology", unidad 13.13.). La evaluación de esta fracción nuclear con el uso de enzimas marcadoras, reveló que había una gran contaminación de citosol. Se realizó a continuación otro paso de purificación, a través de un colchón de sacarosa. Se resuspendió la fracción enriquecida en núcleos en 1,25 M sacarosa y se llevó la solución a 1,62 M sacarosa con el agregado de solución 2,2 M. En un tubo de ultracentrífuga, se sembró una solución 2,2 M de sacarosa por debajo de la siembra de 1,62 M (en una

proporción de 2 volúmenes de 2,2 M por cada 7 volúmenes de 1,62 M). Sobre la superficie, se agregó solución 0,25 M sacarosa. Se ultracentrifugó durante 60 minutos a 28000 rpm en un rotor 70 Ti. Los núcleos, que se encuentran en el pellet, se resuspendieron y fueron utilizados para las mediciones enzimáticas. En una interfase, se visualizaron restos que no se comportaron como núcleos aislados.

15.3. Purificación de la membrana plasmática

La purificación de la fracción de membranas plasmáticas se realizó a partir de los protoplastos, estabilizando su membrana plasmática con concanavalina A, tal cual lo descrito por Hubbard y col. (1986) mediante un proceso que involucra un gradiente de percoll. Esta purificación fue llevada a cabo por la Lic. Katherina Walz.

15.4. Medición de enzimas marcadoras

El grado de contaminación de las fracciones nucleares y de membrana plasmática se evaluó midiendo 5'nucleotidasa de acuerdo a Avruch y Wallach (1971), citrato sintasa de acuerdo a Srere (1969), piruvato kinasa por el método espectrofotométrico descrito por Bücher y Pfeleiderer (1955), y el contenido de ADN de acuerdo a Brunk y col. (1979), como marcadores de membrana plasmática, mitocondria, citosol y núcleo, respectivamente.

16. Discriminación entre fosforilaciones en Serina y en Histidina

La fosforilación en serina y en histidina se diferencian claramente por su estabilidad a los pHs extremos. Mientras la Ser-P es estable a pH ácido e inestable a pH alcalino, la His-P es estable a pHs alcalinos e inestable a pHs ácidos. En la literatura se han descrito distintas metodologías para este fin. En el caso de NDP quinasa, se han utilizado 2 metodologías (MacDonald y col., 1993; Almaula y col., 1995; Muñoz-Dorado y col., 1993).

16.1. Metodologías descriptas

16.1.1. Fijación ácida, tinción y destinción de geles

En trabajos publicados recientemente (MacDonald y col, 1993; Almaula y col, 1995) se utiliza la fijación ácida de geles para depletar el grupo fosfato (-P) de residuos de histidina. La metodología consiste simplemente en teñir y destañir al gel en las soluciones clásicas con ácido acético-metanol.

16.1.2. Estabilidad de las fosfoproteínas sobre Immobilon

Muñoz Dorado y col. (1993) realizaron las pruebas de estabilidad a distintos pHs de la NDP quinasa-P sobre Immobilon. La metodología descrita por los autores consiste en la separación de la fosfoenzima en SDS-PAGE, su transferencia a una membrana de Immobilon, y la tinción de la membrana con Ponceau Red, para localizar a la NDP quinasa. Luego de recortar la banda, se incubó ésta a distintos pHs para determinar la radioactividad liberada. Los buffers utilizados fueron:

50 mM ClH-ClK (pH 1); 50 mM glicina-ClH (pH 3); 0,1 M Tris-ClH (pH 7); 50 mM ClK-OHNa (pH 12); 1M OHK (pH 14).

16.1.3. Metodología mejorada para discriminar Ser-P de His-P en NDP quinasas sobre membranas de Immobilon

Se siguieron los lineamientos trazados por Muñoz Dorado y col. (1993). Los experimentos se realizaron en primera instancia variando sólo la metodología para detectar a la NDP quinasa-P, a fin de recortar la zona del Immobilon. Se realizó la autofosforilación de la NDP quinasa tal como se describió en el ítem correspondiente y se desarrolló una electroforesis (SDS-PAGE) 15 %. Se transfirieron las proteínas del gel a una membrana de Immobilon, se expuso la membrana a placas de rayos X, y luego de detectar la banda fosforilada, se cortó el área correspondiente y se trató en los buffers arriba indicados con el agregado de 5 % metanol durante 2 horas. A los tiempos indicados, se tomó el sobrenadante para la medición de la radioactividad liberada, y se reemplazó con más buffer precalentado en los casos en que se estudió la cinética de defosforilación. Finalizada la incubación, se lavaron las membranas y se las sometió a tratamientos similares pero al otro pH extremo durante otras 2 horas. La radioactividad remanente sobre el Immobilon se midió al final del experimento. La radioactividad total

para cada caso (100%) se obtuvo de la suma de la radioactividad remanente sobre el Immobilon más aquella liberada a los buffers a los diferentes tiempos. La radioactividad total fue aproximadamente igual en cada banda dentro de un mismo experimento (alrededor de 50.000 cpm).

Para determinados experimentos, donde la radioactividad no era suficiente como para realizar la caracterización descrita en el párrafo precedente (por ejemplo, para el análisis de la fosforilación *in vivo*), se sometieron diferentes calles de la membrana de Immobilon a los tratamientos a pH 1 o 14, y se detectó la radioactividad estable a los tratamientos mediante autorradiografía.

16.2. Estabilidad a distintos pHs de la NDP quinasa-P en solución

Se estudió la estabilidad en solución de la NDP quinasa-P pura autofosforilada (en contraposición a los ensayos realizados sobre Immobilon) a distintos pHs (cuyos buffers fueron descritos en el ítem M-16.1.2.). La enzima se autofosforiló de acuerdo a la metodología descrita en el ítem M-8. en presencia de 10 mM EDTA y 0,5 mM Mg^{2+} , y se separó del ATP residual de acuerdo al ítem M-7.1. La fosfoenzima pura aislada de esta manera, se incubó a pH 1, 7 y 14 a 45°C. A distintos tiempos se tomó una alícuota y se evaluó inmediatamente la aparición de Pi y la desaparición de fosfoenzima por cromatografía delgada (TLC) tal cual se describió para separar NTPs (ítem M-5.).

17. Fosforilación de NDP quinasas de distinto origen por CK2

La fosforilación de NDP quinasas se realizó como fue descrito por Engel y col. (1994). La holoenzima CK2 utilizada fue la misma utilizada por Engel y col. en su trabajo, con las subunidades α , α' y β humanas recombinantes (producidas en el laboratorio del Prof. Issinger). La evaluación de la fosforilación se realizó luego de separar las proteínas por SDS-PAGE y de secar el gel, mediante la exposición a placas de rayos X.

La reacción para fosforilar a las diversas NDP quinasas con CK2, se lleva a cabo en un buffer 25 mM Tris-ClH, pH 7,5, 8 mM Cl_2Mg , 150 mM ClNa, 0,5 mM EDTA, 0,2

μM polilisina, y $50 \mu\text{M}$ ATP. El protocolo detallado que se utilizó para la fosforilación por CK2 se detalla a continuación:

Material necesario:

Buffer Tris-ClH 200 mM (pH 7,5)

Cl_2Mg , 80 mM

ClNa, 1 M

EDTA, 5 mM

polilisina, $2 \mu\text{M}$

ATP, $333 \mu\text{M}$

$\text{ATP}\gamma[^{32}\text{P}]$

CK2 (holoenzima) recombinante humana

Protocolo:

El protocolo que se detalla sirve para la realización de un ensayo en un volumen de $20 \mu\text{l}$. Se agregan a un tubo eppendorf, secuencialmente, las siguientes alícuotas de las soluciones antes mencionadas:

$2,5 \mu\text{l}$ buffer Tris-ClH, pH 7,5

$2,5 \mu\text{l}$ Sustrato (NDP quinasa)

$2 \mu\text{l}$ Cl_2Mg

$3 \mu\text{l}$ ClNa

$2 \mu\text{l}$ EDTA

$2 \mu\text{l}$ polilisina

$3 \mu\text{l}$ CK2, en dilución apropiada

$3 \mu\text{l}$ ATP + $\text{ATP}\gamma[^{32}\text{P}]$, ($2 \times 10^6 \text{ cpm}$)

Se realiza la incubación a 37°C . Se detiene la incubación con el agregado de buffer de Laemmli y se desarrolla en SDS-PAGE 15%. La fosforilación se visualiza por medio de autorradiografías del gel.

Para el caso en que la fosforilación se lleva a cabo con la subunidad α , se omite el agregado de ClNa en el buffer de reacción.

18. Hidrólisis ácida de la NDP quinasa-P

La hidrólisis ácida se realizó sobre Immobilon siguiendo los lineamientos de Kamps (1991). Brevemente, la porción de la membrana de Immobilon con NDP quinasa-P obtenida como se describe en el ítem M-16.1.3., se incubó en una solución de ClH 6N a 110°C durante 1 hora en tubos herméticos cerrados con rosca en atmósfera de N₂. Esta incubación drástica en ClH concentrado produce la hidrólisis de uniones peptídicas dentro de la proteína, liberando a la solución péptidos y amino ácidos.

18.1. Separación de los productos de hidrólisis

Los productos de hidrólisis se secaron y se resuspendieron en agua Milli-Q. Esta operación se repitió tres veces. Finalmente los productos de hidrólisis se resuspendieron con una solución acuosa conteniendo 5 nmoles de estándares de Ser-P, Thr-P y Tyr-P, se sembraron en una placa de celulosa (Sigma T6890) y se separaron en una dimensión por medio de una electroforesis a 300 V y 4 mA usando ácido fórmico: ácido acético: agua (50:156:1794, v/v, pH 1.9) como buffer de corrida.

18.2. Reconocimiento de los estándares de fosfo-amino ácidos

Los estándares de amino ácidos fosforilados se reconocieron sobre la placa de celulosa embebiéndola (con pulverizador) en una solución de ninhidrina (0,25% en acetona) y secando con aire caliente.

19. Fosforilación *in vivo* de la NDP quinasa de *C. albicans* y de células HeLa

La fosforilación *in vivo* de la NDP quinasa de *C. albicans* se realizó incubando las células en un medio de cultivo suplementado con ³²Pi tal cual se describe en el ítem M-1.1.2.3. La ruptura de las células se realizó con perlas de vidrio en tubos eppendorf (ver ítem M-2.4.2.3.) en un buffer de homogeneización con inhibidores de proteasas y fosfatasas (ver ítem M-2.2. y 2.3.).

La fosforilación *in vivo* de la NDP quinasa humana se realizó cultivando células HeLa en medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) sin fosfato, en una concentración de 30 µM fosfato (300 µCi ³²P/ml) durante 3 horas. Finalizada esta

incubación, se estimuló el cultivo con el agregado de 10% suero fetal bovino (previamente dializado). La estimulación con suero se realizó durante 2 horas. Quince minutos antes de finalizada la incubación, se agregó ácido okadaico (1 μ M). Las células se lavaron 2 veces con una solución salina a 4°C (Tris HCl 20 mM, pH7,5, ClNa 0,15 M) y finalmente los extractos se realizaron con el agregado de una solución 10 mM Tris HCl, pH 7,6, 5 mM EDTA, 50 mM FNa, 100 μ M vanadato de sodio, 1 mM PMSF y 1% Nonidet P 40. Los extractos, mantenidos a 4°C, se centrifugaron en una microcentrífuga refrigerada a 10000 rpm durante 30 minutos. Esta metodología fue realizada en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas Fundación Campomar, por la Lic. Moira Sauane bajo la dirección del Dr. L. Jiménez de Asúa.

19.1. Inmunoprecipitación

La inmunoprecipitación de la NDP quinasa de *C. albicans* se llevó a cabo preincubando los anticuerpos homólogos anti-NDP quinasa con un extracto de *C. albicans* durante toda la noche a 4°C en un buffer conteniendo 25 mM Tris HCl pH 8, Tween 0,1 %, ClNa 75 mM, inhibidores de proteasas e inhibidores de fosfatasas. Se precipitan los complejos NDP quinasa-anticuerpos mediante una nueva incubación (1-2 horas a 4°C) con proteína A- sepharosa (Sigma P-3391). Se centrifuga durante 1 minuto a 2000 rpm y los inmunoprecipitados así obtenidos, se lavan en 3 oportunidades con el mismo buffer con el agregado de 1% Nonidet P 40. A los inmunoprecipitados se agregó solución de Laemmli 2X saturada en urea, se calentó por 2 minutos a 70°C y se continuó con los pasos descriptos para discriminar Ser-P de His-P (ver el ítem M-16.1.3.).

La inmunoprecipitación de las NDP quinasas humanas se realizó con otros anticuerpos y variando el tiempo de incubación. Los anticuerpos específicos utilizados fueron una mezcla de anticuerpos monoclonales anti-NDP quinasa de *Dictyostelium* junto con un anticuerpo anti-NDP quinasa humana purificado por afinidad, obtenidos a través del Dr. M. Véron. La incubación con el anticuerpo específico se realizó durante 1 hora.

20. Materiales

Los materiales y solventes utilizados, que no se especifican en los correspondientes ítems, fueron al menos de grado analítico.

RESULTADOS

1. NDP quinasa durante el Crecimiento y Morfogénesis de *C. albicans*

1.1. NDP quinasa durante el crecimiento

La actividad NDP quinasa se estudió durante el crecimiento levaduriforme de *C. albicans*. La medida de actividad se relativizó a la proteína total, calculándose, entonces, la actividad específica (Ae) de la enzima en cada etapa del cultivo.

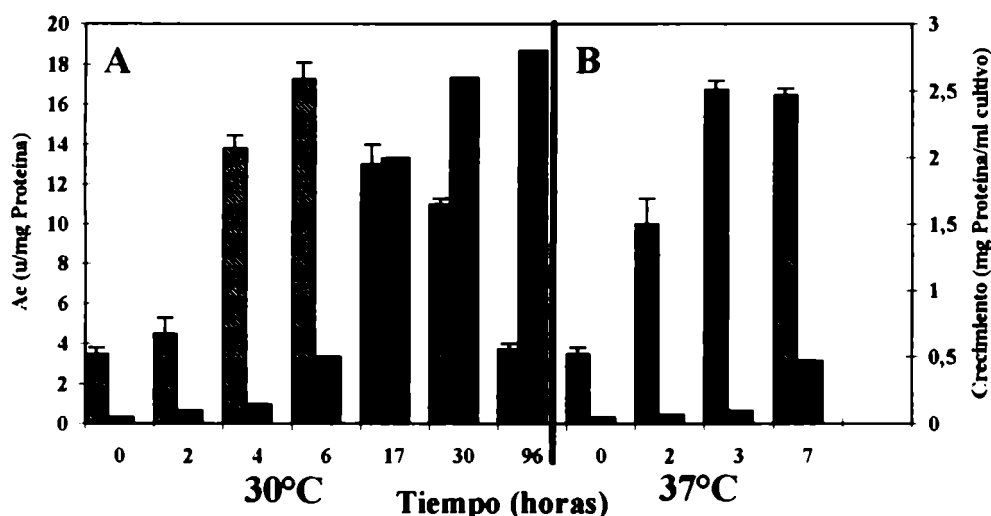


Figura R-1. Actividad específica de la NDP quinasa de *C. albicans* durante el crecimiento y durante la morfogénesis inducida por temperatura. Las células se crecieron y se indujeron para la morfogénesis de acuerdo a los ítems M-1.1.2.1. y M-1.1.3.1. La actividad específica de la NDP quinasa se midió en sobrenadantes de 100000 g. La variación de la actividad específica (Ae) durante el crecimiento y durante la morfogénesis se presenta en los paneles A y B, respectivamente (Ae, barras rayadas; crecimiento, barras negras).

Se encontró que la Ae era mínima en cultivos estacionarios tardíos (3 u/mg) y máxima durante el crecimiento logarítmico (17 u/mg) disminuyendo en la fase de crecimiento logarítmico tardío (11 u/mg) y fase estacionaria (3 u/mg), volviendo a los niveles iniciales de la fase estacionaria tardía original (ver **figura R-1.**). La cantidad de NDP quinasa se correlacionó (salvo en el tiempo 2 horas) con el aumento de la actividad específica, como se observa por su detección con anticuerpos anti-NDP quinasa de *Dictyostelium* en la banda de 17 kDa (ver **figura R-2.**). Dado que hay un aumento de NDP quinasa que acompaña al aumento de actividad específica, estos resultados indican que el aumento en actividad estaría relacionado en gran medida con la mayor cantidad de

enzima. Sin embargo, al tiempo 2 horas de crecimiento se observa por Western-blot un aumento importante de la NDP quinasa que es mayor al aumento registrado en la actividad (ver **figuras R-1. y R-2.**). Este dato sugiere que podría haber un mecanismo de regulación que inhibiese la actividad enzimática de la NDP quinasa.

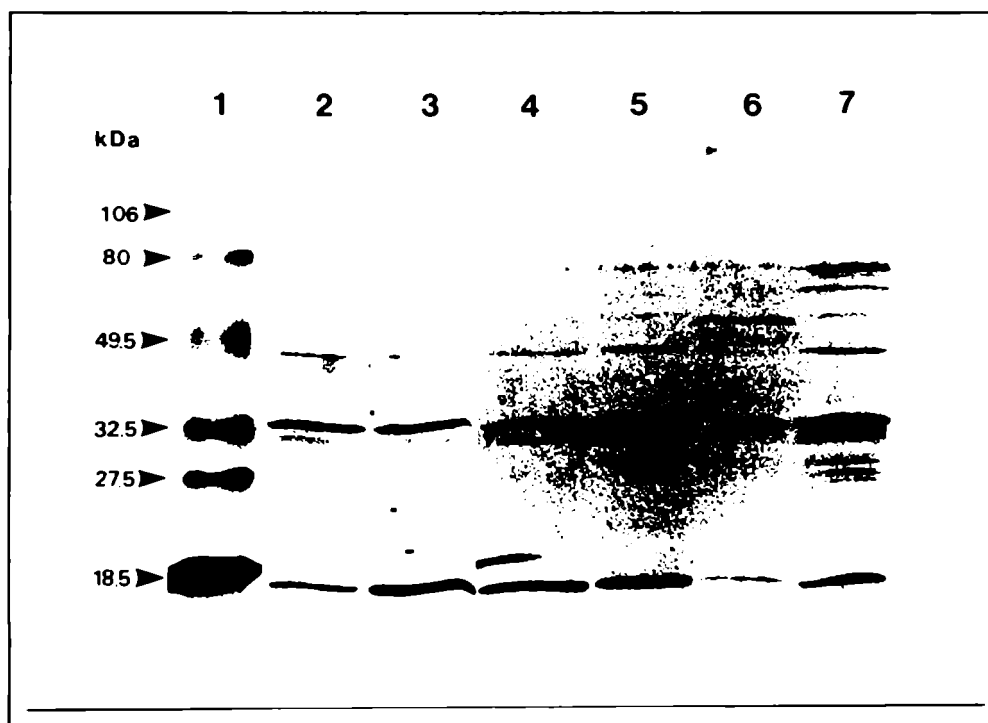


Figura R-2. Detección de la NDP quinasa durante el crecimiento y morfogénesis de *C. albicans*. Se detectó la NDP quinasa de *C. albicans* por Western-blot utilizando anticuerpos anti-NDP quinasa de *Dictyostelium*. La presencia de NDP quinasa se detectó durante el crecimiento a 30°C (calles 2 a 5) y durante la morfogénesis a 37°C (calles 6 y 7). Calle 1, marcadores de PM y NDP quinasa de *Dictyostelium*; calles 2, 3, 4 y 5, cultivos de 96, 2, 17 y 30 horas (100 µg de proteína por calle); calles 6 y 7, 0 y 2 horas de morfogénesis (30 µg de proteína por calle). Las bandas de mayor peso molecular reconocidas por el anticuerpo contra NDP quinasa podrían ser dímeros ó multímeros de esta enzima las cuales han sido también detectadas en *Drosophila* y *D. discoideum* (Rosengard y col., 1989; M. Véron, comunicación personal).

Cuando se evaluó la Ae de la NDP quinasa en otros dos medios de cultivo (YNBG, bases nitrogenadas de levadura, sin amino ácidos y medio de Lee, ver M-1.1.2.2.), se observó que en todas las ocasiones, la Ae era máxima en la fase logarítmica y mínima en la estacionaria tardía (ver **tabla R-1.**). Sin embargo, no se observó una adecuada correlación con el tiempo de generación para cada cultivo; este hecho podría indicar que la división celular no sería el único factor responsable del aumento de actividad específica; factores metabólicos también podrían tener influencia en este proceso. En este sentido, se ha descripto que la NDP quinasa de *Pseudomonas*

aeruginosa forma un complejo con la enzima succinil-CoA sintetasa (Kavanaugh-Black y col., 1994), relacionándose así más profundamente con el metabolismo energético (Schlichtman y col., 1994).

Tabla R-1. Variación de la actividad específica (Ae) de la NDP quinasa de *C. albicans* durante el crecimiento en diferentes medios de cultivo. La Ae se evaluó en extractos crudos de *C. albicans* en las fases logarítmicas (log.) y estacionarias (est.) del cultivo. El tiempo de generación se evaluó sólo durante el crecimiento logarítmico por conteo celular en cámara de Neubauer.

	Soll y Bedell		YNBG		Lee	
	log.	est.	log.	est.	log.	est.
NDP quinasa (Ae u/mg)	12	3	4,3	0,2	4,4	1,9
Tiempo de generación (minutos)	45	-	72	-	90	-

1.2. NDP quinasa durante la morfogénesis

Para estudiar la NDP quinasa durante la morfogénesis de *C. albicans*, ésta se indujo mediante 2 procedimientos. En ambos casos hay una variable diferente (temperatura o pH) entre aquellos cultivos que morfogénizan y aquellos controles que permanecen en la forma levaduriforme.

Una de las maneras de inducir la morfogénesis en *C. albicans* es mediante la dilución de un cultivo estacionario tardío en un medio rico a 37-39°C, mientras que una dilución del cultivo en un medio a 30°C sirve como control (ver M-1.1.3.1.). Bajo estas condiciones de morfogénesis, ésta comienza entre los 60 y 90 minutos y luego las células extienden sus tubos germinativos.

Al cabo de 2 horas de inducción, la Ae aumentó en diferentes experimentos entre 40 y 250% en un cultivo que morfogénizaba a 38°C en comparación a uno que, diluido de igual manera e incubado a 30°C, no morfogénizaba (ver **figura R-1.**).

En la figura R-2., en las calles 6 y 7 se observa el reconocimiento de la NDP quinasa al tiempo 0 y 2 horas de morfogénesis. Existe un aumento importante en la cantidad de NDP quinasa durante las primeras 2 horas de morfogénesis que correlaciona bien con el aumento observado en la actividad enzimática.

Cuando se midió crecimiento celular en ambos cultivos se comprobó que durante las primeras 2 horas había un leve crecimiento lineal con el tiempo; recién al cabo de 3 horas comenzó la fase logarítmica en aquel cultivo creciendo a 30 °C, mientras que a ese tiempo, todavía no comenzaba en el cultivo con crecimiento filamentoso. Por lo tanto, el crecimiento celular, que comprobamos que influye sobre la actividad específica de la NDP quinasa, no estaría afectando la comparación entre el cultivo morfogenizado y su control al cabo de 2 horas.

La inducción de la morfogénesis se realizó asimismo por pH. Los cultivos estacionarios crecidos a 25 °C se diluyeron en un medio definido a pH 4,5 o 6,5 precalentados a 37 °C (ver M-1.1.3.2.). Los cultivos a pH 4,5 no forman tubos germinativos mientras que aquellos que fueron incubados a pH 6,5 sí los forman. La Ae durante la morfogénesis se presenta en la **tabla R-2.**; ésta se determinó cada 30 minutos. Transcurrida 1 hora 30 minutos, las células comenzaron a formar tubos germinativos. Al cabo de 2 horas de inducción a pH 6,5, el 95% de las células estaban germinadas y extendían sus tubos germinativos, mientras que a pH 4,5 menos del 5% formó tubos germinativos. Hasta 1 hora 30 minutos, las Aes no diferían de manera importante entre los cultivos a pH 4,5 ó 6,5. Sin embargo, correlacionándose con el crecimiento de los tubos germinativos, la Ae de la NDP quinasa fue 2-2,5 veces en los cultivos a pH 6,5 comparados con los cultivos control (pH 4,5).

Nuevamente se comprobó que este aumento era independiente del crecimiento a ambos pHs.

Tabla R-2. Variación de la actividad específica (Ae) de la NDP quinasa de *Candida albicans* durante la inducción de la morfogénesis (pH 6,5) en comparación al control (pH 4,5). Se indujo la morfogénesis elevando la temperatura de los cultivos a 37°C en medios de cultivo a pH 6,5 (para inducir la morfogénesis) o a pH 4,5 (para continuar con el crecimiento levaduriforme). A los tiempos indicados se tomaron alícuotas, y se midió la Ae de la NDP quinasa en extractos crudos. Bajo estas condiciones, menos de un 5% de las células formaron tubos germinativos a pH 4,5 mientras que a pH 6,5, los tubos germinativos aparecieron entre 70 y 90 minutos después de la inducción en más del 90% de las células.

El crecimiento celular se evaluó en ambos cultivos durante el tiempo del experimento. Durante la primera hora de inducción, la masa celular fue constante. Desde este momento hasta el final del experimento (2,5 horas) hubo un aumento constante, siendo éste siempre un poco mayor en el cultivo en crecimiento levaduriforme respecto del que extendía los tubos germinativos.

Tiempo (horas)	Actividad específica relativa *	
	pH 4,5	pH 6,5
0	100	100
0.5	138,6 ± 36,4	150 ± 15,9
1	145,3 ± 23,6	147 ± 38,6
1.5	136,4 ± 22,7	185,7 ± 11,4
2	146,4 ± 15,9	352,3 ± 56,8
2.5	157,3 ± 11,4	409 ± 27,3

*Los valores se expresan como porcentajes (considerando al tiempo 0 como 100%).

1.3. Integración

Observamos que la Ae de la NDP quinasa aumenta con el crecimiento y con la morfogénesis. Este aumento se correlaciona con la cantidad de NDP quinasa en cada estadio. La mayor actividad específica estaría dada, entonces, por mayor síntesis de esta proteína durante el crecimiento logarítmico y durante el elongamiento hifal.

Pese a que existe una clara correlación entre el aumento de actividad NDP quinasa y la intensidad de las bandas halladas por Western-blot, se vió que en cierto momento del crecimiento (2 horas) habría un mayor aumento en la cantidad de NDP quinasa que en su actividad.

Un aumento de Ae en los cultivos que morfogenizan respecto de aquellos que se preparan para el crecimiento levaduriforme podría deberse no sólo a un aumento de la síntesis de NDP quinasa (que se registra en ambos casos) sino también a la cantidad de otras proteínas que se sintetizan.

En estudios realizados sobre otros sistemas, la actividad NDP quinasa también se correlacionó con el crecimiento de células humanas en cultivo (Keim y col., 1992), y en líneas tumorales (De La Rosa y col., 1994). Más recientemente, se describió que la síntesis del ARNm para NDP quinasa A y B humanas ocurre durante la etapa S del ciclo celular (Caligo y col., 1995).

El hecho de que la NDP quinasa se exprese en una etapa temprana del ciclo celular podría determinar un aumento de Ae transitoria. A su vez, si el ciclo celular es rápido, y no se encuentran ciclando en fase (como ocurre durante el crecimiento logarítmico de *C. albicans*) este hecho se manifestaría en un aumento de Ae total. Cuando el ciclo celular se hace más largo, el período donde la NDP quinasa se encuentra mayormente expresada se diluiría y es así como podría caer hasta los niveles basales cuando la célula no se divide.

Entre los experimentos presentados, hay datos que provienen de cultivos moderadamente sincronizados. Los ensayos con células creciendo en forma más sincronizadas son aquellos donde se incuban cultivos estacionarios tardíos para su morfogénesis o para su crecimiento durante períodos de tiempo cortos, hasta la primera división celular (Soll y Bedell, 1978). Así, en el ensayo de crecimiento a 2 horas de cultivo, donde se encuentra NDP quinasa parcialmente inhibida, las células se encontraban sincronizadas. Este hecho podría indicar que durante el ciclo celular la NDP quinasa podría activarse o inactivarse.

2. Purificación y Caracterización

2.1. Purificación

La metodología utilizada para la purificación se detalla en Materiales y Métodos, ítem M-6. El éxito de la purificación se basa en el primer paso de purificación. La NDP quinasa se une fuertemente a la columna de Blue-Sepharosa, y se mantiene unida en una proporción importante aún con el agregado de 250 mM ClNa. La NDP quinasa se eluye específicamente con el agregado de 1,5 mM ATP a baja fuerza iónica.

La razón del comportamiento de la NDP quinasa en la columna de Blue-Sepharosa, proviene de la capacidad del colorante cibacron-blue de actuar como

inhibidor de la enzima (Lascu y col., 1983). El colorante se une con gran afinidad a la proteína defosforilada, pero no a la proteína autofosforilada (este mismo principio fue utilizado con éxito para la caracterización de la NDP quinasa de *C. albicans* con el fin de bloquear la actividad enzimática luego que hubiera liberado el grupo fosfato de alta energía, ver ítems M-7.3. y R-2.2.5.3.).

La NDP quinasa unida a la columna de Blue-Sepharosa con una cierta K_d se despegas del colorante y no se vuelve a unir una vez autofosforilada con el agregado de ATP, eluyendo así de la columna. Éste y los demás pasos de purificación se resumen en la **tabla R-3**. En la **figura R-3**, se muestra el perfil de proteínas proveniente de las dos primeras etapas de purificación.

Como la proteína sale muy diluida de la columna de pseudo-afinidad, se siembra directamente en una columna de Q-Sepharosa, con el principal objeto de concentrar la enzima, ya que ésta queda unida a la columna al pH seleccionado.

Al eluir la proteína con un gradiente salino, ésta se separa de otras proteínas contaminantes. En este punto, la pureza de la proteína es aproximadamente del 70%. Sin embargo, si en esta etapa se eligen las fracciones de mayor Ae, se obtiene enzima con una pureza de alrededor de 90-95%. Para la mayor parte de los ensayos cinéticos, la proteína utilizada fue concentrada a partir de fracciones de esta etapa de purificación, con una pureza aproximada de 95%.

Tabla R-3. Purificación de la NDP quinasa de *Candida albicans*. La purificación se realizó de acuerdo al protocolo descrito en Materiales y Métodos, (ítem M-6.). La medida de actividad NDP quinasa se realizó por el método descrito en el ítem M-4.1.2., utilizando piruvato quinasa como enzima acoplada.

Fracción	Proteína (mg)	Actividad (unidades)	Actividad específica (unidades/mg)	Veces de purificación	Recupe- ración %
Extracto crudo	2 400	20 000	8,3	1	100
S100	1 200	18 000	15	1,8	90
Blue-Sepharosa	1,3	6 000	4 500	540	30
Q-Sepharosa	0,38	3 000	7 800	940	15
Red-agarosa	0,19	2 000	10 500	1 265	10

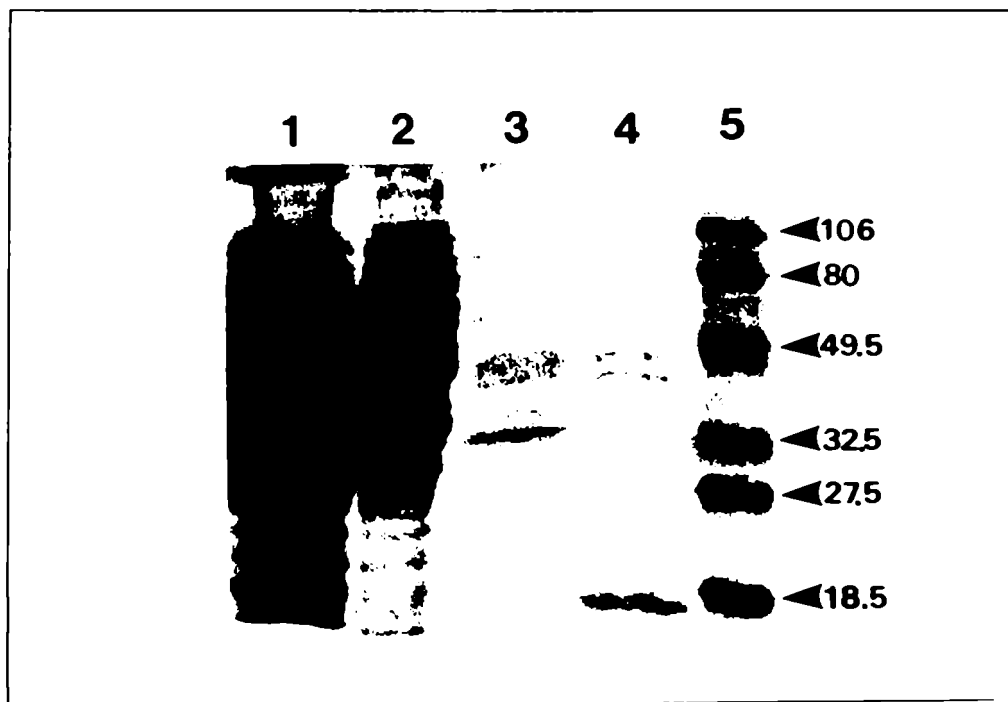


Figura R-3. Perfil de la purificación parcial de la NDP quinasa de *C. albicans*. Calle 1, extracto total; calle 2, sobrenadante de 100000g; calle 3, eluido de Blue-Sepharosa; calle 4, eluido de Q-Sepharosa; calle 5, marcadores de PM.

Para realizar los estudios con la proteína purificada a homogeneidad, se sembró la proteína obtenida en una columna de Red-Sepharosa. La enzima fue eluida con GDP, compitiendo con el sitio de unión a la columna.

Se obtuvo una secuencia parcial de la NDP quinasa de *C. albicans* (ver **figura R-4**). De la comparación con las secuencias de otras NDP quinasas, se concluye que se trata de una porción importante del sitio activo de la enzima. La porción secuenciada es muy homóloga al resto de las NDP quinasas; se encuentra presente la histidina que se autofosforila, las serinas en posición +2 y +4 de esta histidina, y el residuo de ácido glutámico equivalente a la posición 130 en la secuencia de *Dictyostelium*, importante para posicionar correctamente al grupo imidazol de la histidina reactiva. Es interesante destacar que las enzimas de levaduras, *S cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* y *C. albicans*, son las únicas que poseen un residuo de cisteína inmediatamente antes que la histidina del sitio activo.

NDPK ^a -A (Nm23-H1) humana	N.I.I.H*.G.S.D.S.V.E.S.A.E.K.E.I.G.L.W.F.H
NDPK-B (Nm23-H2) humana	N.I.I.H*.G.S.D.S.V.K.S.A.E.K.E.I.S.L.W.F.K
NDPK (Awd) <i>Drosophila</i>	N.I.I.H*.G.S.D.A.V.E.S.A.E.K.E.I.A.L.W.F.N
NDPK cyto. <i>D. discoideum</i>	N.I.I.H*.G.S.D.S.V.E.S.A.N.R.E.I.A.L.W.F.K
NDPK mito. <i>D. discoideum</i>	N.I.I.H*.G.S.D.S.N.E.S.A.A.H.E.I.A.L.W.F.K
NDPK <i>M. xhantus</i>	N.T.V.H*.G.S.D.S.L.E.N.A.K.I.E.I.A.Y.F.F.R
NDPK <i>E. coli</i>	N.G.T.H*.G.S.D.S.V.E.S.A.A.R.E.I.A.Y.F.F.G
NDPK <i>S. cerevisiae</i>	N.V.C.H*.G.S.D.S.V.D.S.A.E.R.E.I.N.L.W.F.K
NDPK <i>S. pombe</i>	N.V.C.H*.G.S.D.S.Y.E.S.A.N.R.E.Y.K.L.W.F.Q
NDPK <i>C. albicans</i>	N.V.C.H*.G.S.D.S.V.E.S.A.N.K.E.I.D.L.W.F.K

Figura R-4. Secuencia parcial de la NDP quinasa de *C. albicans*. Comparación con otras secuencias conocidas. La histidina remarcada en negrita es aquella que se fosforila produciendo el intermediario de alta energía característico de la reacción; los residuos subrayados son aquellos conservados entre las NDP quinasa de levaduras. ^a NDPK, NDP quinasa.

2.2. Caracterización

Se realizó una caracterización de la NDP quinasa de *C. albicans* respecto de su tamaño en forma nativa y desnaturalizada, su punto isoelectrico, y de la cinética de la reacción con distintos sustratos naturales y análogos sintéticos.

2.2.1. Tamaño de la NDP quinasa nativa de *C. albicans*

El tamaño de la NDP quinasa nativa se obtuvo, como se indica en Materiales y Métodos (ítem M-9.), a partir de su coeficiente de sedimentación (5,7 S, **figura R-5.A**), obtenido por gradiente de sacarosa, y de su radio de Stokes (3,75, **figura R-5.B**), obtenido por tamiz molecular, suponiendo un volumen específico parcial de 0,74 ml/g. El tamaño calculado para la enzima nativa fue de 99 kDa.

Un valor similar se obtuvo cuando la proteína purificada a homogeneidad se estudió por otra metodología utilizando geles nativos de distinto tamaño de poro (realizado en nuestro laboratorio por la Lic. Katherina Walz).

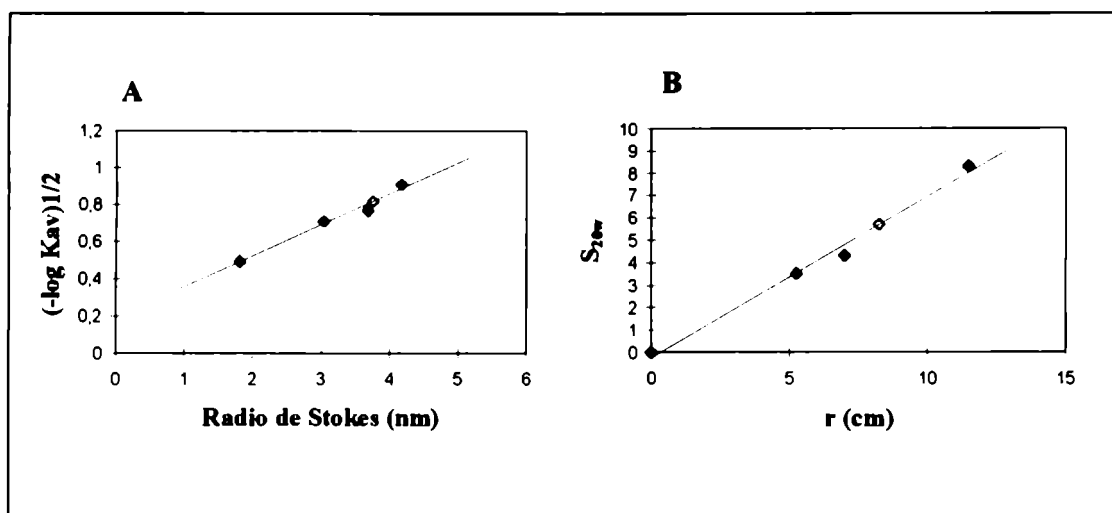


Figura R-5. Tamaño de la NDP quinasa nativa. Obtención del radio de Stokes y del coeficiente de sedimentación. (A). El radio de Stokes se calculó a partir de una filtración en gel en una columna de Sephacryl S-200 utilizando como estándares al citocromo c (1,8), peroxidasa (3,04), malato deshidrogenasa (3,69) y glucosa oxidasa (4,18). (B). El coeficiente de sedimentación se obtuvo a partir de un gradiente de sacarosa utilizando como estándares a la peroxidasa (3,5 S), malato deshidrogenasa (4,32 S), y glucosa oxidasa (8,3 S).

2.2.2. Tamaño de las subunidades de NDP quinasa de *C. albicans*

El tamaño de las subunidades que componen a la proteína nativa se determinó en geles de poliácridamida desnaturalizantes (ver ítem M-10.). El PM de la proteína se estimó en 16,5 kDa (ver **figura R-9.**).

De acuerdo al tamaño de la proteína nativa (100 kDa), y al de sus subunidades, se comprueba que la NDP quinasa de *C. albicans* es un hexámero.

2.2.3. Punto Isoeléctrico de la NDP quinasa purificada de *C. albicans*

Se realizó una estimación del punto isoelectrico de la NDP quinasa nativa de *C. albicans* purificada. Como se observa en la **figura R-6.**, se encuentra una única proteína; ésta es ácida, con un pI de aproximadamente 4,5.

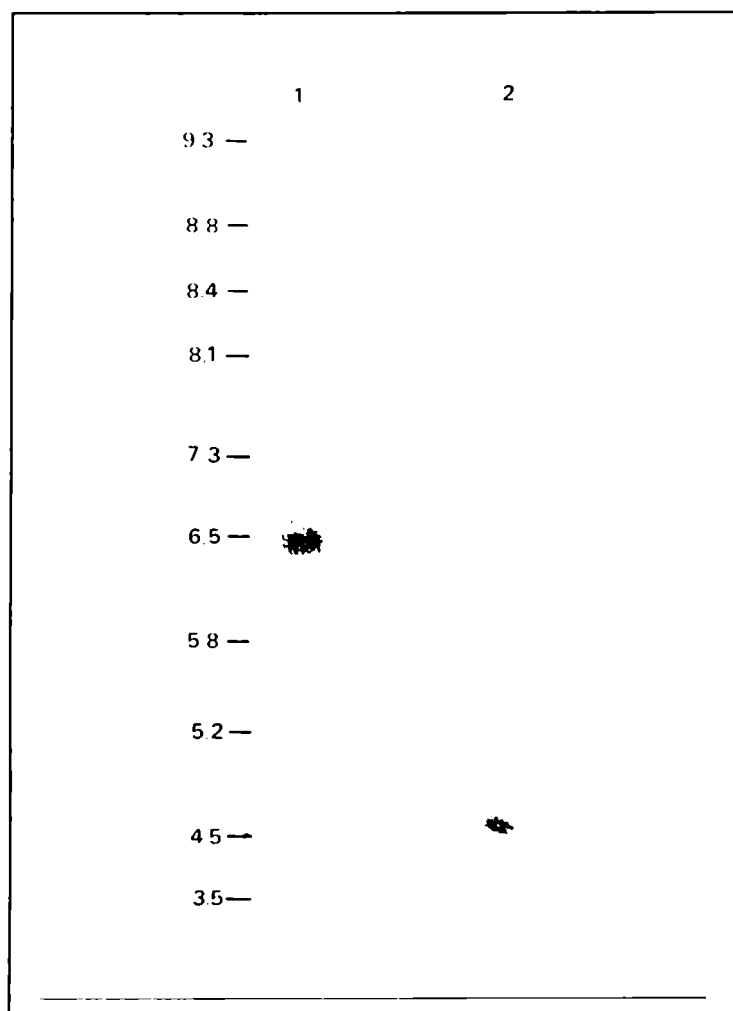


Figura R-6. Estimación del *pI* de la NDP quinasa de *C. albicans*. Calle 1, marcadores de *pI*; calle 2, NDP quinasa purificada.

2.2.4. Estabilidad térmica de la NDP quinasa purificada de *C. albicans*

En la **figura R-7**, se muestra la inactivación térmica de la enzima de *C. albicans* a distintas temperaturas. Sólo hubo una brusca e irreversible disminución de la actividad cuando ésta fue incubada a 70°C. Luego de la incubación a 50°C durante 1 hora la actividad enzimática o bien fue estable o fue capaz de volver a su conformación activa con relativa facilidad durante la incubación, ya que prácticamente no hay disminución en la actividad que se mide luego del tratamiento. Estos datos hablan de una proteína muy estable a la temperatura.

Podría pensarse incluso, que la incubación de un extracto crudo a 50°C durante 1 hora y la posterior centrifugación podría formar parte de algún protocolo para su purificación.

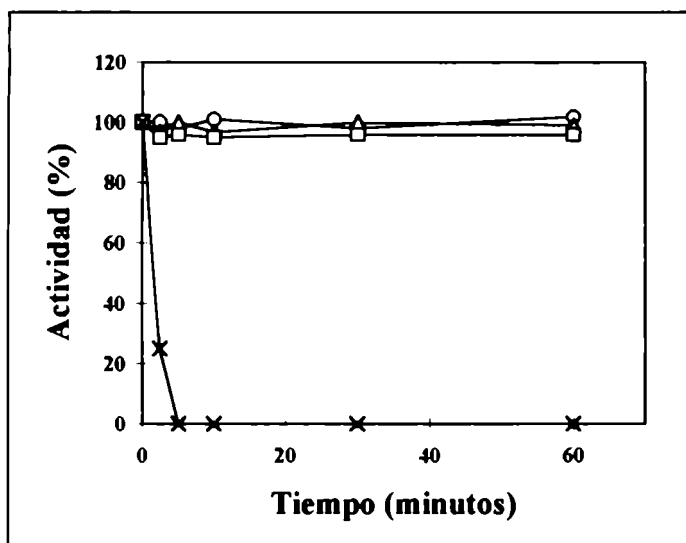


Figura R-7. Estabilidad térmica de la NDP quinasa. La estabilidad a la temperatura se estudió como se describe en el ítem M-13. Se preincubó la enzima por diferentes tiempos a las siguientes temperaturas: 4°C (círculos), 37°C (triángulos), 50°C (cuadrados) y 80°C (asterisco). A los tiempos indicados se tomaron alícuotas y la medida de actividad se realizó inmediatamente con el método de dos enzimas acopladas, o bien luego de ser mantenidas las alícuotas a 4°C hasta la medición. En ambos casos el resultado fue idéntico.

2.2.5. Autofosforilación

Se realizó una cinética de autofosforilación a 4°C con la metodología de filtración por membranas de nitrocelulosa como se describe en Materiales y Métodos, -ítem M-7.- (ver figura R-8.). Se puede observar que al cabo del tiempo más corto estudiado (15 segundos) la autofosforilación fue casi completa. La cantidad de fosfato unido a la proteína se calculó en 0,9 moles por mol de subunidad de 16,5 kDa. La radioactividad medida estaba asociada a la especie de 16,5 kDa (ver ítem siguiente).

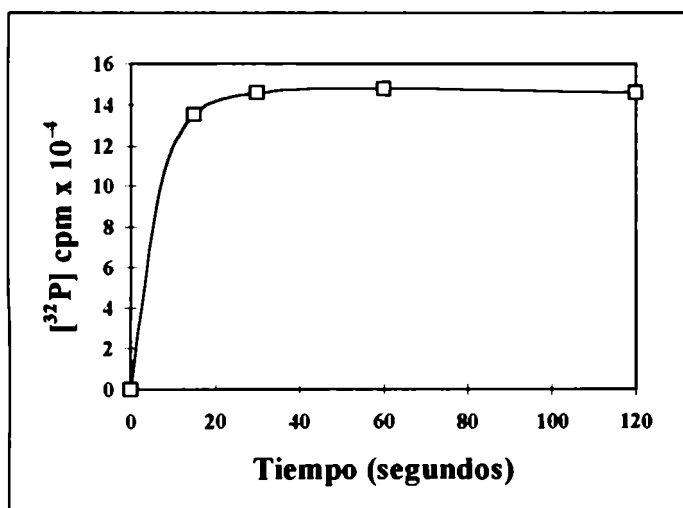


Figura R-8. Cinética de autofosforilación. Se incubó a la NDP quinasa con ATP[γ³²P]; a los tiempos indicados se detuvo la reacción e inmediatamente se filtró por una membrana de nitrocelulosa.

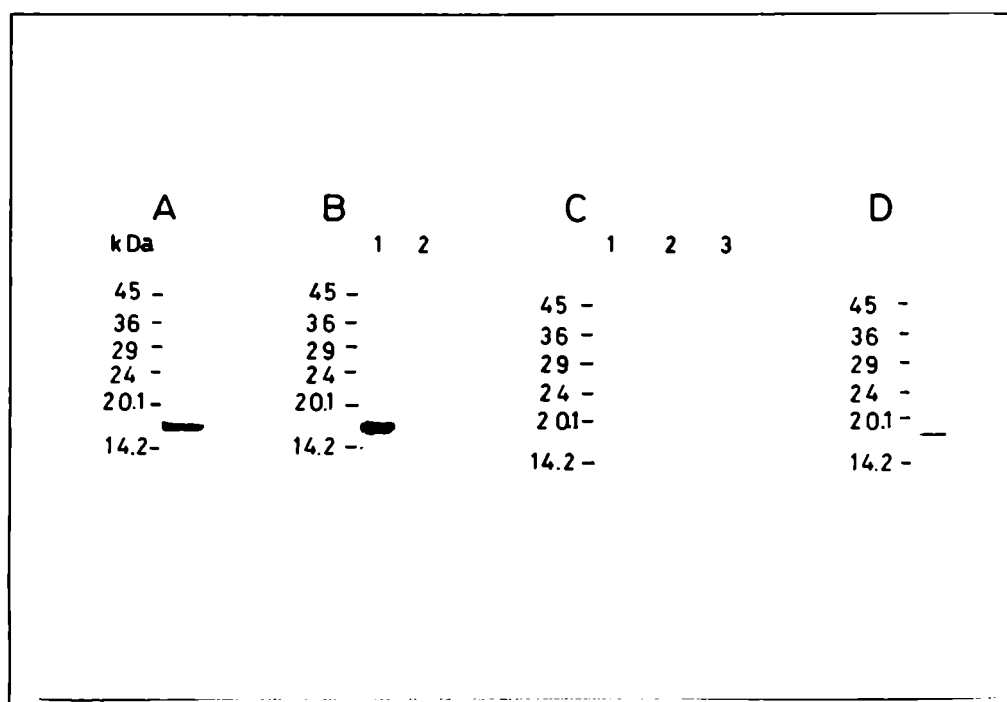


Figura R-9. Análisis electroforético de la NDP quinasa de *C. albicans*. A- NDP quinasa purificada teñida con Coomassie blue R-250. B- Fosforilación - defosforilación del intermediario de alta energía de la reacción. La NDP quinasa se autofosforiló como se describe en Materiales y Métodos (con 1 mM EDTA y 1 mM Cl_2Mg), calle 1; al cabo de 5 minutos, se tomó una alícuota, se le agregó GDP 60 μM y se incubó durante 1 minuto adicional (calle 2). Finalizadas las incubaciones, se detuvo la reacción con el agregado de buffer de Laemmli. C- Detección por Western-blot de las NDP quinasas en extractos crudos (calle 3), de la parcialmente purificada de membrana plasmática (calle 1), y de la purificada soluble (calle 2). D- NDP quinasa parcialmente purificada de membrana plasmática teñida con Coomassie blue R-250. La purificación de la NDP quinasa asociada a membrana plasmática fue realizada por la Lic. Katherina Walz.

2.2.5.1. Defosforilación por transferencia de fosfato a NDPs

Cuando el producto de la fosforilación se separó por SDS-PAGE, se observó una banda de 16,5 kDa fosforilada (**figura R-9. B, calle 1**). Cuando se agregó un NDP aceptor como GDP, la radioactividad asociada a la subunidad de 16,5 kDa prácticamente desapareció (**figura R-9. B, calle 2**), y sólo se hace visible después de mayores tiempos de exposición. Cuando se tiñó el gel, no se observaron diferencias significativas en la posición de la proteína ya sea que estuviera autofosforilada o no.

Para estudiar la capacidad de la NDP quinasa de ceder el fosfato de alta energía a distintos NDPs, se autofosforiló la enzima con $\text{ATP}\gamma^{32}\text{P}$, se separó del ATP remanente mediante un pasaje por una columna de P_2 (ítem M-7.1.), y se la incubó con distintos NDPs. Como se muestra en la **figura R-10.**, todos los NDPs estudiados fueron sustrato de la (P)NDP quinasa y produjeron los correspondientes NTP^{32}P , visualizados por autorradiografía de una cromatografía ascendente (ver ítem M-5.).

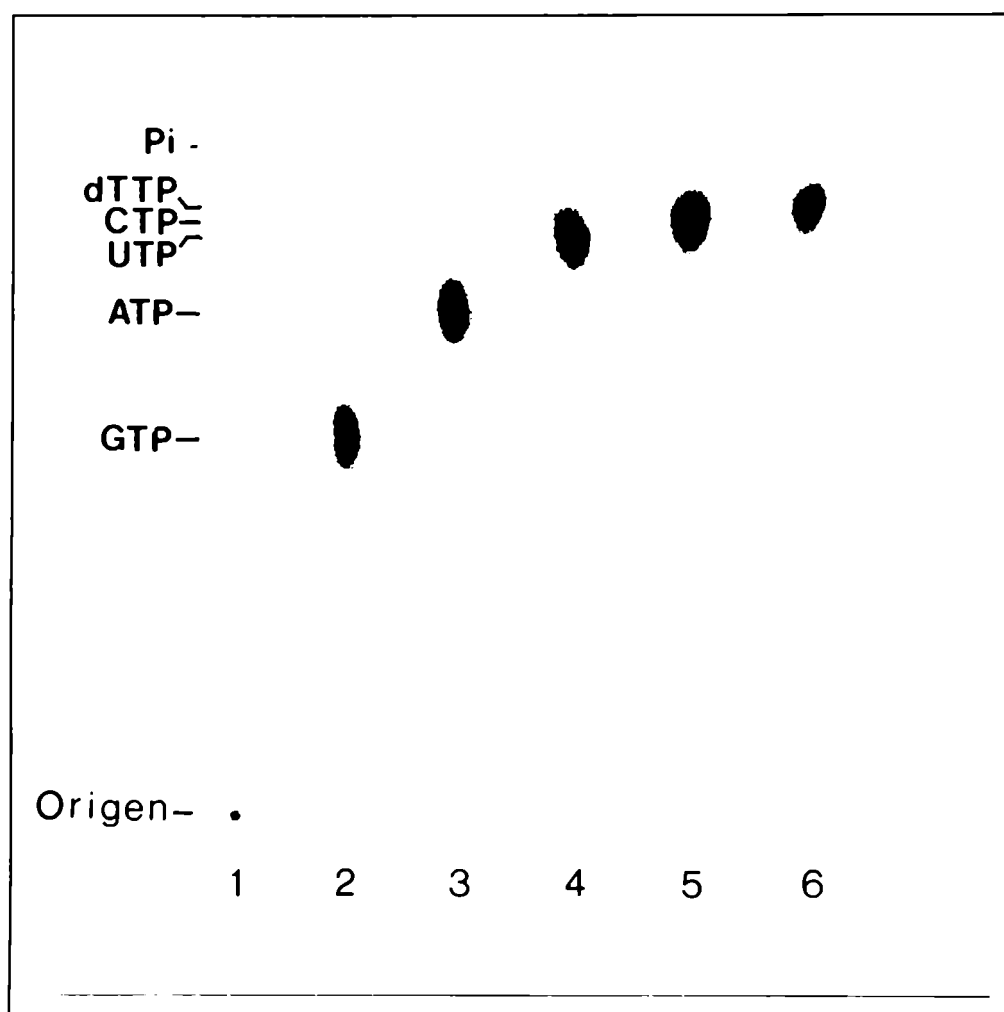


Figura R-10. Formación de NTPs a partir de (P)NDP quinasa. La NDP quinasa se autofosforiló, se separó del ATP no reaccionante y se incubó con GDP (calle 2), ADP (calle 3), UDP (calle 4), CDP (calle 5), y TDP (calle 6); en la calle 1 se sembró una alícuota de (P)NDP quinasa.

2.2.5.2. Competencia de NDPs como aceptores de la reacción

La NDP quinasa autofosforilada y aislada del ATP se incubó con 30 μ M GDP conjuntamente con iguales concentraciones de ADP, UDP, CDP, o TDP. Se observó de esta manera que la cantidad de GTP y de los correspondientes NTPs formados era muy similar, aproximadamente del 50% (ver **figura R-11.**).

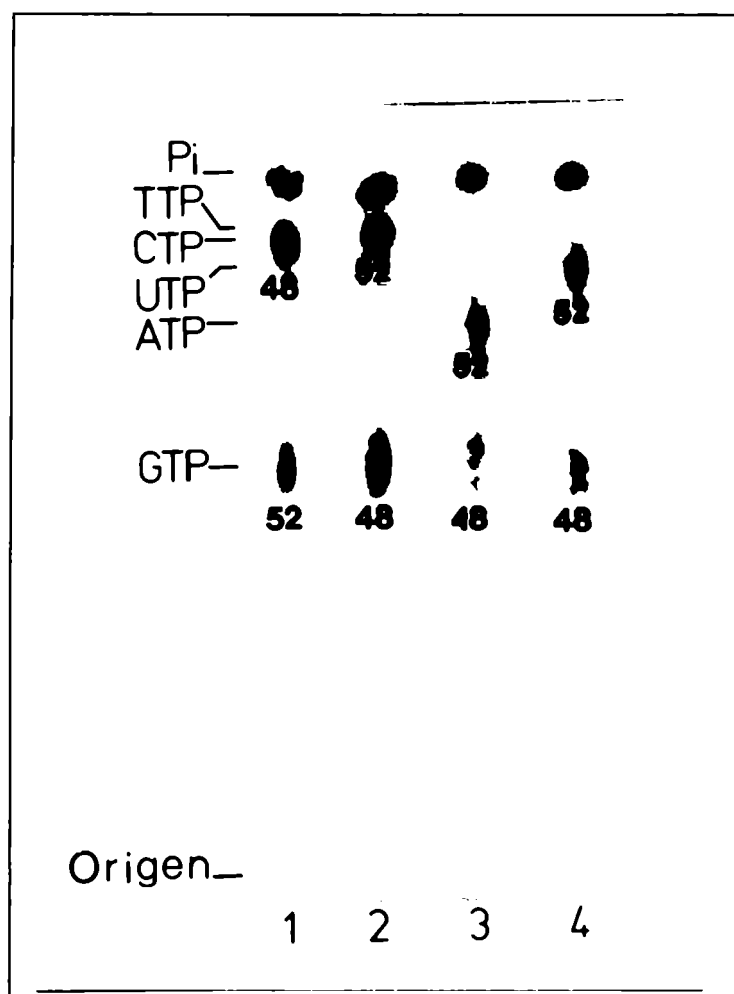


Figura R-11. Competencia de aceptores de la reacción. La (P)NDP quinasa se incubó con GDP + distintos NDPs. En la calle 1, con CDP; calle 2 con TDP; calle 3 con ADP; calle 4 con UDP.

2.2.5.3. Competencia de NDPs como aceptores en presencia de cibacron-blue

Como se detalló en el ítem R-2.1., el colorante cibacron-blue es capaz de unirse con alta afinidad a la enzima defosforilada inhibiéndola, pero no a la que se encuentra autofosforilada. Por lo tanto, se incubó la NDP quinasa autofosforilada y aislada como se describió en el ítem previo con el colorante cibacron-blue 3GA y luego, en presencia del colorante, se incubó con GDP más diversos NDPs. Con este experimento, se intentó bloquear a la enzima una vez que liberó su fosfato de alta energía, para medir una única transferencia de fosfato por molécula de enzima. Como se observa en la **figura R-12.**, bajo estas condiciones, 20 μ M del colorante bloquearon la actividad enzimática. Bajo estas condiciones se realizó un ensayo de competencia obteniéndose resultados diferentes a los observados en ausencia de cibacron-blue (ver **figura R-13.**).

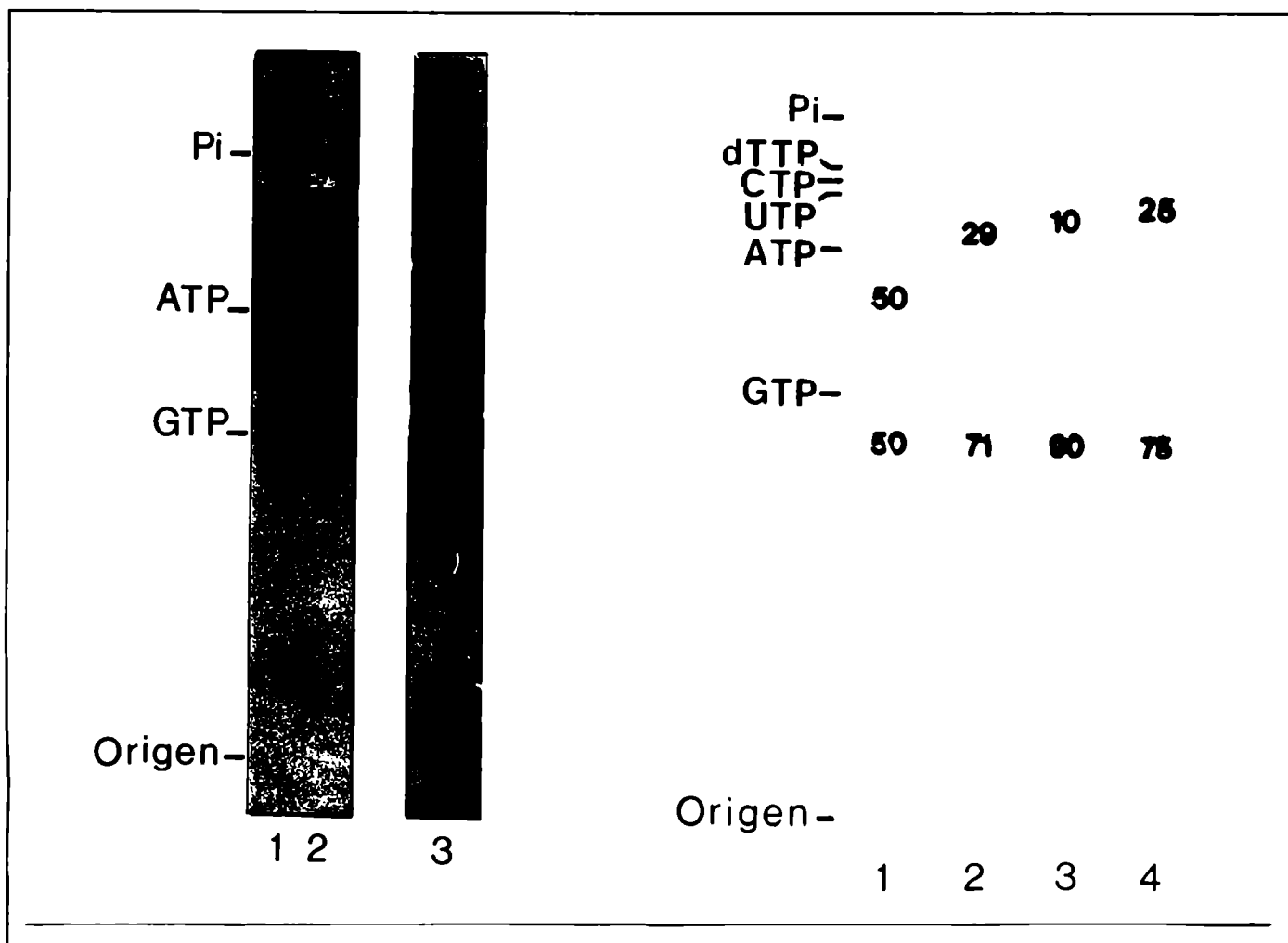


Figura R-12. (izquierda). Inhibición de la actividad NDP quinasa por el agregado de cibacron-blue. En la calle 3 se incubó ATP[$\gamma^{32}\text{P}$] con el buffer de reacción (con GDP) en ausencia de NDP quinasa. En la calle 1 se agregó NDP quinasa y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Debido a la concentración de enzima, se presume que se llegó al equilibrio en una fracción de segundo. En la calle 2 se incubó a la enzima antes y durante la reacción con cibacron-blue.

Figura R-13. (derecha). Competencia de aceptores de la reacción en presencia de cibacron-blue. Se incubó la (P)NDP quinasa igual que en la figura R-11. en presencia de cibacron-blue. La concentración del colorante fue la utilizada para inhibir la actividad enzimática (20 μM , ver figura R-12.)

El GDP resultó ser mejor aceptor que el TDP, CDP y UDP, y similar al ADP. El CDP fue el NDP que compitió en menor medida con el GDP.

2.2.6. Cinética de NDP quinasa de *C. albicans* frente a distintos dadores y aceptores de la reacción

Se ensayó la actividad NDP quinasa fijando la concentración de uno de los sustratos y variando la del otro. La actividad con distintos NTPs y NDPs se estudió

mediante distintas metodologías, tal como se describe en el ítem M-4. Es importante tener en cuenta que de esta manera se obtiene la velocidad máxima aparente ($V_{\max \text{ ap}}$) y la constante de Michaelis aparente ($K_m \text{ ap}$). Si bien los valores de K_m y V_{\max} reales no fueron calculados, el cociente de k_{cat} (V_{\max} expresada por mol de enzima) sobre $K_m \text{ ap}$ es un valor real y no aparente.

2.2.6.1. Nucleótidos naturales

En la **tabla R-4**, se dan los valores de $K_m \text{ ap}$ y $V_{\max \text{ ap}}$ y de V_{\max}/K_m para distintos sustratos. De la tabla se desprende que básicamente las velocidades máximas son similares para los distintos nucleótidos, con la única excepción del CTP. La diferencia fundamental se encuentra en los valores de las $K_m \text{ ap}$. Entre los NDPs y los NTPs, los nucleótidos con base purínica tienen menor K_m , siendo los de guanina los de mayor afinidad (menor K_m), y consiguientemente mayor eficiencia catalítica.

Tabla R-4. Constantes cinéticas aparentes para distintos sustratos de la NDP quinasa de *Candida albicans*. Los ensayos se realizaron de acuerdo a los protocolos descriptos en Materiales y Métodos, ítem M-4, utilizando 0,1 mM GDP y concentraciones variables de NTPs ó bien utilizando 1 mM ATP y concentraciones variables de NDPs. Las estimaciones de las constantes aparentes de Michaelis (K_m) y velocidades máximas (V_{\max}) se obtuvieron ajustando los datos a hipérbolas de acuerdo a la ecuación de Michaelis-Menten. ^a Los ensayos se realizaron con el método directo; ^b, los ensayos se realizaron con enzimas acopladas.

Sustrato variable	K_m (mM)	V_{\max} (mmol/min/mg)	V_{\max}/K_m
ATP ^a	1,06 ± 0,19	10,0 ± 0,95	9,4 ± 2,6
GTP ^a	0,61 ± 0,23	11,9 ± 1,80	19,5 ± 10,3
dTTP ^a	3,25 ± 0,92	4,0 ± 0,63	1,2 ± 0,5
CTP ^a	27,2 ± 5,3	16,3 ± 2,24	0,6 ± 0,2
UTP ^a	2,3 ± 0,3	5,4 ± 0,24	2,3 ± 0,4
ADP ^a	0,093 ± 0,021	10,8 ± 1,20	116,1 ± 39,1
GDP ^a	0,053 ± 0,005	10,8 ± 0,60	203,8 ± 30,5
CDP ^b	0,379 ± 0,038	12,4 ± 0,57	32,7 ± 4,8
dTDP ^b	0,287 ± 0,041	10,0 ± 0,58	34,8 ± 7,0

2.2.6.2. Análogos de nucleótidos

Se estudió la capacidad de diversas NDP quinasas de utilizar como sustrato de la reacción a análogos trifosfatos y difosfatos, con especial énfasis en AZT-TP y AZT-DP como dadores y aceptores de la reacción.

Utilizando ADP^{14}C (0,1 mM) como aceptor de la reacción, se determinó la K_m y $V_{\text{máx}}$ ap para el AZT-TP usando las NDP quinasas de *Dictyostelium* (salvaje y mutante N119A), y NDP quinasa de *C. albicans* (ver tabla R-5.).

Tabla R-5. Constantes cinéticas aparentes para los análogos de nucleótidos AZT-TP y AZT-DP en comparación con los nucleótidos naturales de adenina. Se estudió la capacidad *in vitro* de utilización de análogos de nucleótidos como sustratos para NDP quinasas de distintos orígenes. En la tabla se muestran las constantes de Michaelis (K_m) y velocidad máxima ($V_{\text{máx}}$) aparentes para las enzimas de *Candida albicans* y las enzimas de *Dictyostelium* salvaje y la mutante del sitio activo N119A. Los estudios variando las concentraciones de NTPs se realizaron con ADP^{14}C 0,1 mM, mientras que cuando se estudiaron los NDPs como aceptores, el dador fue $\text{GTP}\gamma^{32}\text{P}$ 1 mM.

NDP quinasa	K_m	$V_{\text{máx}}$
<i>Candida albicans</i>	(mM)	(u/mg)
ATP	$1,11 \pm 0,22$	3240 ± 336 (100%)
AZT-TP	$6,2 \pm 1,8$	$2,25 \pm 0,49$ (0,07%)
ADP	$0,1 \pm 0,05$	2950 ± 350 (100%)
AZT-DP ^a	$0,85 \pm 0,20$	$3,1 \pm 0,4$ (0,11%)
NDP quinasa salvaje		
<i>Dictyostelium</i>		
ATP	$0,52 \pm 0,12$	1646 ± 136 (100%)
AZT-TP	$3,3 \pm 1,3$	$4,5 \pm 0,65$ (0.27%)
ADP	$0,080 \pm 0,060$	1750 ± 211 (100%)
AZT-DP ^a	$0,85 \pm 0,20$	$1,8 \pm 0,18$ (0.10%)
NDP quinasa N119A		
<i>Dictyostelium</i>		
ATP	$0,40 \pm 0,09$	$36,1 \pm 2,6$ (100%)
AZT-TP	$2,34 \pm 0,64$	$1,21 \pm 0,12$ (3.4%)
ADP	$0,067 \pm 0,061$	64 ± 25 (100%)
AZT-DP ^a	$0,37 \pm 0,16$	$1,45 \pm 0,16$ (2.3%)

^a Valores obtenidos utilizando PK y PEP durante la reacción (ver ítem R-2.2.6.3.).

Para todas las enzimas el perfil de la curva de reacción fue similar y sólo varió apreciablemente la $V_{\text{máx}}$ obtenida. En este punto, es importante destacar que en todos los casos, la actividad enzimática máxima fue unas 100 veces menor para el AZT-TP respecto del dador natural del fosfato *in vivo*, el ATP. La K_m fue alrededor de 6 veces mayor para el AZT-TP respecto del ATP.

La mutante N119A tiene una actividad disminuida respecto de la salvaje (2% utilizando al ATP como dador de la reacción; Tepper y col., 1994). Sin embargo, su actividad específica respecto del AZT-TP varía sólo levemente en comparación a la enzima salvaje.

2.2.6.3. Variación en la técnica para medición de AZT-DP como aceptor

Cuando se midió la actividad enzimática de la NDP quinasa con $\text{GTP}\gamma^{32}\text{P}$ como dador y AZT-DP como aceptor, se encontró que no se podía obtener linealidad durante la reacción. Dado que la aparición de GDP tras la hidrólisis del GTP podría estar compitiendo con el AZT-DP, se repitieron los ensayos con el agregado de ClK, PEP y PK. De esta manera, se pudieron obtener valores lineales en un muy amplio rango de concentraciones y tiempos estudiados. A su vez, de esta manera, la concentración de dador (GTP) se mantuvo siempre constante.

Se deduce de la **tabla R-5**, que en condiciones en que la enzima mutada N119A y la salvaje producen 100 unidades de ATP^{14}C , la salvaje producirá 0,1 unidades de AZT-TP, mientras que N119A producirá 22,5 veces más.

2.2.6.4. Inhibición por NDPs y NTPs

La reacción enzimática es inhibida por cantidades crecientes de NDPs y NTPs. Este efecto se observó con todos los NDPs y su inhibición fue mayor con aquellos que son mejores sustratos de la enzima. Esta inhibición sería dada por la formación de complejos enzima-sustratos, inactivos. En la **figura R-14**, se muestra a modo de ejemplo, algunas de las inhibiciones observadas.

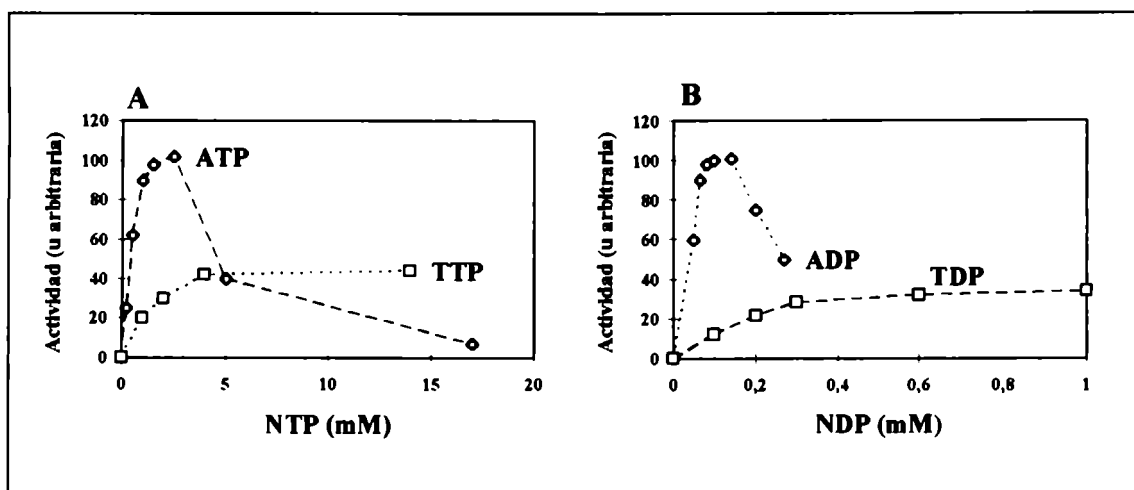


Figura R-14. Inhibición de la reacción por formación del complejo enzima-sustrato inactivo. Se midió la actividad de la NDP quinasa de *C. albicans* variando la relación NTP-NDP. **A-** Las concentraciones de ATP y TTP se aumentaron manteniendo fija la concentración del aceptor GDP (0.1 mM). **B-** Manteniendo fija la concentración de ATP (1 mM), se estudió la variación de la actividad con el agregado de cantidades crecientes de ADP y TDP. En estos ejemplos se observa sólo la inhibición por los nucleótidos de adenina. La inhibición con TDP comienza a insinuarse a una concentración 2 mM.

2.3. Integración

De acuerdo a los estudios presentados en esta sección, la NDP quinasa de *C. albicans* es un hexámero de aproximadamente 99 kDa, muy probablemente compuesto por un único tipo de subunidad de 16,5 kDa. Tanto en electroforesis en geles nativos, como en geles desnaturalizantes, se observó una única banda de proteína. Más aún, la proteína presentó una única banda en la electroforesis nativa para determinar su punto isoeléctrico.

Es interesante destacar que si el tamaño de la proteína nativa hubiese sido estimado únicamente en base a la filtración molecular, el valor obtenido hubiese sido de 75-80 kDa.

Diversos autores han utilizado sólo el criterio del tamiz molecular para establecer el tamaño de la NDP quinasa estudiada (Muñoz-Dorado y col., 1990; Jong y Ma, 1991; Koyama y col., 1984; Parks y Agarwal, 1973). En el caso de *M. xanthus*, utilizando el tamiz molecular como criterio de PM, se estimó que la NDP quinasa era un trímero (Muñoz-Dorado y col., 1990). En estudios posteriores, al realizar la cristalografía y difracción por rayos X, determinaron que en realidad se trataba de un tetrámero.

Si bien existen citas en donde se describen diversas NDP quinasas eucariotas como tetraméricas (Jong y Ma, 1991; Koyama y col., 1984; Parks y Agarwal, 1973), estos datos bien podrían ser medidas por defecto debido al comportamiento característico de las NDP quinasas en el tamiz molecular.

Las NDP quinasas de organismos eucariotas donde se estudió la estructura cristalina demostraron ser hexámeros (*Dictyostelium*, *Drosophila*, NDP quinasa B humana).

En principio, las NDP quinasas eucariotas serían hexámeros mientras que las procarióticas serían tetrámeros.

En base a la secuencia parcial de la proteína de *C. albicans* se puede afirmar que ésta es muy homóloga a las NDP quinasas cuyas secuencias son conocidas; de la comparación con las restantes secuencias se concluye que las enzimas de levaduras poseen una característica común, diferente a las restantes: poseen una cisteína inmediatamente antes de la histidina del sitio activo. Los estudios de fosforilación de NDP quinasas por CK2 *in vitro* adscriben el posible sitio de fosforilación a las serinas en posiciones +2 y +4 respecto de esta histidina; estas serinas están presentes en la NDP quinasa de *C. albicans*.

La estabilidad térmica sirvió a Fukuchi y col. (1994) para diferenciar a las NDP quinasas α y β de rata (de pIs 7,8 y 6,7, respectivamente). La NDP quinasa de *C. albicans* tiene un comportamiento similar a la NDP quinasa α , y bien diferente de la β , que es inestable a 50°C.

De acuerdo a los estudios cinéticos realizados, se concluye que el GDP y el ADP son los aceptores preferidos por la NDP quinasa de *C. albicans*. La especificidad de sustrato encontrada es muy diferente de la hallada para la NDP quinasa de levaduras por Jong y Ma (1991).

Muy recientemente, se determinó la estructura de la NDP quinasa B complejada a GDP (Morera y col., 1995). Se observa en la estructura que existe una unión específica entre el amino ácido C terminal de una subunidad vecina y la base del nucleótido. En los casos de NDP quinasas complejadas a ADP y TDP, se había predicho una unión indirecta

a través de una molécula de agua, no habiendo ninguna unión puente de hidrógeno entre la base y la proteína. El contacto entre el extremo C terminal y la base de guanina podría dar en parte una explicación estructural para la mayor afinidad que se registra con el GDP respecto de otros nucleótidos.

La preferencia de utilizar el GDP como aceptor de la reacción, apoya la posibilidad de que esta enzima esté relacionada con proteínas que unen GTP. Como se detalló en la Introducción, hay numerosas evidencias de una interacción importante entre proteínas G (monoméricas y triméricas) y NDP quinasas.

En otras especies, por ejemplo en espinaca, donde se han descrito recientemente 3 NDP quinasas diferentes, éstas difieren en su preferencia por ADP y GDP (Zhang y col., 1995). Los autores postulan que tendrían diferente localización y función.

Los resultados obtenidos con análogos de nucleótidos prueban, primeramente, que existe una similitud muy importante en el sitio activo de las distintas NDP quinasas. Prácticamente no hay diferencias en la capacidad de metabolizar AZT-TP entre las enzimas de distinto origen estudiadas. En segunda instancia, los resultados prueban que el AZT-DP y TP no son buenos sustratos de las NDP quinasas. Como se comentó en la introducción, estos análogos son utilizados como inhibidores virales (especialmente contra HIV) y deben ser fosforilados intracelularmente hasta AZT-TP para actuar como inhibidores de la transcriptasa reversa viral. Se ha considerado siempre a la NDP quinasa como la enzima encargada de la última fosforilación de estos análogos (convirtiendo los N-DPs en N-TPs). Los resultados presentados podrían explicar el hecho que *in vivo* se acumule AZT-MP, AZT-DP y en menor medida AZT-TP (en relación inversa a lo que acontece con los nucleótidos naturales). El AZT-MP sería el metabolito que trae aparejada la toxicidad (Tornevik y col., 1995).

Estudios posteriores, llevados a cabo por la Dra. J. Bourdais (1996), demuestran que otros análogos de nucleótidos naturales como el 3'dATP, ddATP, ddTTP no son buenos sustratos de la NDP quinasa B humana y que la ausencia del OH 3' sería la responsable de la baja actividad enzimática.

El conocimiento de la estructura de las enzimas celulares responsables de la síntesis de los análogos-TPs activos debería permitir el desarrollo racional de inhibidores virales.

En el caso del AZT, el metabolito más tóxico es el AZT-MP; su acumulación tal vez se deba (al menos en parte) a la baja eficiencia de las NDP quinasas para forzar la reacción hacia la formación de AZT-TP.

3. Localización intracelular

3.1. Membrana plasmática

En base a los estudios realizados, entre el 8 y el 15 % de la actividad NDP quinasa se encontró asociada a membrana plasmática (ver **tabla R-6.**). Los valores reales podrían ser mayores, ya que la enzima 5'nucleotidasa (marcadora de membrana plasmática) no se recuperó en ninguna ocasión en una proporción mayor al 50 %. Cuando se controló si existía contaminación de otras fracciones intracelulares, se verificó que la contaminación nuclear (por medida de ADN), la mitocondrial (por medida de citrato sintasa), y citoplasmática (por medida de piruvato quinasa), eran el 0,01, 0,7, y 0,001 % de la actividad encontrada en protoplastos (0,8 mg, 12,7 μ mol/min y 800 mmol/min, respectivamente, en el experimento mostrado en la tabla R-6.).

Tabla R-6. Asociación de la NDP quinasa a fracciones de membrana plasmática purificada. Se midió actividad 5'nucleotidasa y NDP quinasa en protoplastos lisados y en la fracción de membrana plasmática purificada. Los porcentajes indican la proporción de actividad enzimática encontrada en membrana plasmática respecto del total medido en protoplastos. La medida de la actividad 5'nucleotidasa fue utilizada como marcadora de membrana plasmática.

	Proteína (mg)	5'nucleotidasa		NDP quinasa	
		Actividad específica (u/mg)	(%)	Actividad específica (u/mg)	(%)
Protoplastos	55	2,6	100	10,6	100
Membr. Plasm.	7,2	8,4	41,4	9,3	11,9

3.2. Fracción nuclear

Se preparó la fracción nuclear a partir de protoplastos como se describe en el ítem M-15.2. Se verificó que los núcleos estaban en gran proporción intactos (de

acuerdo a la tinción de los mismos con técnicas histológicas realizadas en frotis y visualizadas con microscopio óptico). Sin embargo, la recuperación de ADN fue baja, del 3,5 %. Los resultados de un experimento se resumen en la **tabla R-7**. Al cuantificar el porcentaje de NDP quinasa en la fracción nuclear respecto de la actividad original en los protoplastos, ésta fue del 0,2 %. Considerando la recuperación de ADN obtenida, la proporción de NDP quinasa en la fracción nuclear sería del 5,8 % (en diferentes ensayos, entre este valor y 10 %). Se cuantificó, entonces, la contaminación citoplasmática (fracción donde más abunda la NDP quinasa) en la fracción nuclear midiendo una enzima marcadora de citosol, la piruvato quinasa. En base a esta medida, se cuantificó el porcentaje de contaminación con citosol, siendo éste del 4,3 %. A partir de estos datos, se puede concluir que en la fracción nuclear podría haber 0,05% de la actividad NDP quinasa total. Esta proporción, a su vez, podría deberse a la contaminación por membrana plasmática, en donde sí comprobamos una importante proporción de NDP quinasa.

Tabla R-7. Estudio de asociación de la NDP quinasa de *Candida albicans* a la fracción nuclear. Se obtuvo una fracción nuclear como se indica en Materiales y Métodos, en el ítem M-15.2. La recuperación de núcleos, a juzgar por la medición de ADN fue del 3,5%. La recuperación de las actividades enzimáticas respecto del total en el lisado de protoplastos se expresan como porcentajes. La piruvato quinasa y la 5' nucleotidasa fueron medidas como marcadores de citosol y membrana plasmática respectivamente.

	NDP quinasa	Piruvato quinasa	5' nucleotidasa
	(%)	(%)	(%)
Protoplastos	100	100	100
Fr. nuclear	0,2	0,15	1

En base a los resultados obtenidos, concluimos que la localización intranuclear de la NDP quinasa en *C. albicans* no es fácilmente medible y no sería significativa respecto del total. Si bien no se puede afirmar su presencia en núcleo, tampoco la podemos descartar. De existir, no sería mayor al 1 % de la actividad total.

3.3. Fracción soluble

La actividad NDP quinasa se encontró en gran medida, asociada a la fracción soluble. Cuando las células se rompieron con alúmina, y se realizaron ultracentrifugaciones a 100000g durante 1 h, la actividad asociada a la fracción soluble fue mayor al 99 %. Sólo cuando se trataron a las células con el máximo de cuidado, con una ruptura muy suave, se logró encontrar una proporción importante de enzima en la membrana plasmática. El hecho de encontrarla en fracciones solubles no necesariamente implica que es ésta su ubicación natural. Lo que sí se puede inferir es que la fracción unida a la membrana, debe estar asociada en una forma muy lábil, probablemente en equilibrio con una parte soluble.

3.4. Integración

Los hallazgos en cuanto a la localización intracelular de la NDP quinasa en *C. albicans*, apoyan un rol fundamentalmente asociado a citosol y a membrana plasmática.

Si bien no se encontraron valores significativos en la fracción nuclear, no se puede descartar una función en el núcleo llevada a cabo con una parte minoritaria de la proteína total.

Como se indicó en la introducción, la acción de la NDP quinasa en núcleo ha sido descripta por su capacidad de actuar como factor de transcripción. Hasta el momento, se ha comprobado esta función sólo para la isoenzima humana B (de pI básico, 9,1). La otra isoenzima descripta en humanos, la NDP quinasa A (pI ácido) que posee un 88 % de homología a la B, no ha sido capaz de unir ADN ni ARN *in vitro*. No se sabe en la actualidad si la capacidad de unir ácidos nucleicos es sólo una característica de las NDP quinasas básicas. Si fuese este el caso, no se esperaría que la NDP quinasa de *C. albicans* cumpliera esta función ya que el pI de la enzima es de 4,5.

La localización sobre la membrana plasmática podría relacionarse a la función atribuida a la NDP quinasa como canalizador de GTP a las proteínas G transductoras de señales (Kimura y Johnson, 1983; Ohtsuki y col., 1986; 1987; Kimura y Shimada, 1988a; Wieland y Jakobs, 1992; Bominaar y col., 1993; Haney y Broach, 1994). En algunos casos, se ha visto que la actividad NDP quinasa en las membranas plasmáticas puede variar por estímulos extracelulares (Kimura y Johnson, 1983; Pulido-Cejudo y col., 1995). En *C. albicans* proteínas G con subunidades α_i , α_s han sido caracterizadas

(Paveto y col., 1991; 1992), esta última asociada a la activación de la adenilil ciclasa mediada por hormonas del hospedador (ver Introducción).

En este mismo sentido, la NDP quinasa también podría estar formando complejos con las proteínas G monoméricas (ARF, Rab) en el transporte intracelular de vesículas (Martin y col., 1995; Zerial y Stenmark, 1993).

4. Fosforilación de NDP quinasas

La fosforilación de las NDP quinasas en residuos distintos de la histidina del sitio activo, ha sido motivo de recientes estudios en diversos laboratorios. En las enzimas de *M. xanthus* y *E. coli* la autofosforilación hallada en serina es cerca del 50 % del total (Muñoz-Dorado y col., 1990; Almaula y col., 1995). Steeg y col. estudiaron la autofosforilación de la NDP quinasa A humana, hallando que también se autofosforila en serina (MacDonald y col., 1993). A su vez los autores la encontraron fosforilada en serina en estudios de fosforilación *in vivo*, y establecieron una correlación entre la fosforilación y la inhibición de metástasis (no hallándose una correlación entre el potencial metastásico y la actividad enzimática; MacDonald y col., 1993).

Muy recientemente se ha descripto la fosforilación de distintas NDP quinasas por la proteína quinasa CK2 (Engel y col., 1994).

Este hallazgo permite conjeturar que la fosforilación encontrada *in vivo* podría provenir tanto de autofosforilación como de fosforilación por CK2.

El estudio de la fosforilación en serina podría ayudar al entendimiento de las funciones no del todo explicadas de las NDP quinasas.

Con esta intención, se estudiaron las distintas fosforilaciones sobre la NDP quinasa de *C. albicans*. Se describe, a continuación, una metodología mejorada para la discriminación de fosforilaciones en serina cuando la fosforilación en histidina es muy elevada, se evalúa la posible autofosforilación en serina, la fosforilación por CK2, la fosforilación *in vivo*, y el efecto de la fosforilación por CK2 sobre la actividad enzimática de la NDP quinasa A humana.

Para mayor claridad, en esta sección se realizan 2 integraciones parciales que comprenden el estudio de la autofosforilación en serina de la NDP quinasa de *C.*

albicans, y el estudio del efecto del Mg^{2+} sobre la autofosforilación. En una tercera parte, se profundiza en el estudio de la fosforilación por CK2 *in vitro* y la fosforilación *in vivo*.

4.1. Cuantificación de la autofosforilación en serina

4.1.1. Metodologías para la discriminación entre His-P y Ser-P

En una primera etapa, se repitieron distintas metodologías que habían sido empleadas por otros autores para revelar la presencia de autofosforilación en el amino ácido serina.

La primera, adjudicaba a la tinción y destinción ácida de los geles de poliacrilamida la capacidad de depletar el fosfato de residuos de histidina (MacDonald y col, 1993; Almaula y col, 1995).

Se reprodujo esta metodología, entonces, con los controles adecuados. Para ello, se autofosforiló la NDP quinasa de *C. albicans*, y además una alícuota se defosforiló con una posterior incubación con GDP. Las muestras se sometieron a SDS-PAGE por duplicado, y una parte del gel se incubó con buffer de transferencia (pH 8,3) mientras que la otra se tiñó y se destiñó en una solución con ácido acético - metanol (ver M-16.1.1.). En la **figura R-15**, se puede observar la autorradiografía de dicho ensayo en donde se comprueba que este tratamiento con fijación ácida del gel no depleta del fosfato a la NDP quinasa, y que la fosforilación remanente luego del tratamiento es similar a la del control. En los paneles A y B se observa que los niveles de NDP quinasa-P disminuyen con el agregado de GDP; ésto indica que la radioactividad que se observa en las calles 1 se corresponde con el intermediario de alta energía de la reacción, His-P. A pesar de que no se puede afirmar que no hubo defosforilación en el gel incubado a pH 8,3, lo que sí resulta claro es que el teñido y desteñido de geles no es una metodología confiable para eliminar el fosfato en residuos de histidina, al menos en la NDP quinasa.

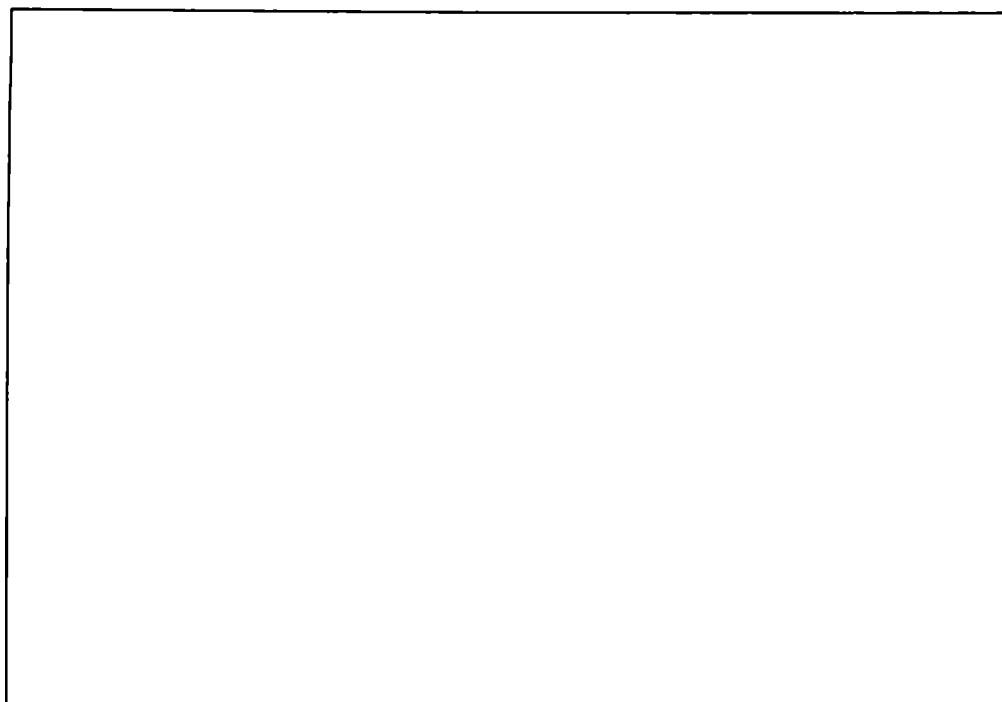


Figura R-15. Metodología del tñido y desteñido del gel para depletar de fosforilación en histidina. Se sembró en el gel por duplicado NDP quinasa autofosforilada (calles 1) y defosforilada por incubación con GDP (calles 2). El panel A fue tratado con solución tñidora y desteñidora; el panel B fue incubado en buffer de transferencia.

La segunda metodología descrita para distinguir la fosforilación en histidina de aquella en serina consiste en separar la NDP quinasa-P en SDS-PAGE, transferir las proteínas a una membrana de Immobilon, incubar la proteína fosforilada en distintos buffers con variados pHs, y medir la radioactividad liberada al buffer y aquella remanente sobre la membrana (ver M-16.1.2.). La membrana de Immobilon permite realizar esta metodología ya que es muy estable y mantiene unida a las proteínas tanto en condiciones ácidas como alcalinas. Como se señaló anteriormente, los residuos de serina fosforilados son estables a pH ácido y lábiles al álcali, en oposición al fosfato unido a residuos de histidina, que es estable al álcali y lábil a pH ácido.

Se realizó el estudio, entonces, sobre la NDP quinasa de *C. albicans* autofosforilada. Los resultados obtenidos de 4 experimentos diferentes, muestran que existe entre 80-90% de fosforilación resistente al álcali y entre 15-30% de radioactividad resistente al tratamiento ácido (**figura R-16.**). Bajo estas condiciones, Muñoz Dorado y col., encontraron que para la NDP quinasa de *M. xanthus*, aproximadamente el 50% de la radioactividad era estable a pH ácido. En base a este resultado, y al hallazgo de Ser-P

después de hidrólisis ácida fuerte, aseguraron la presencia y la importancia en magnitud de esta fosforilación (Muñoz Dorado y col., 1993; Almaula y col, 1995).

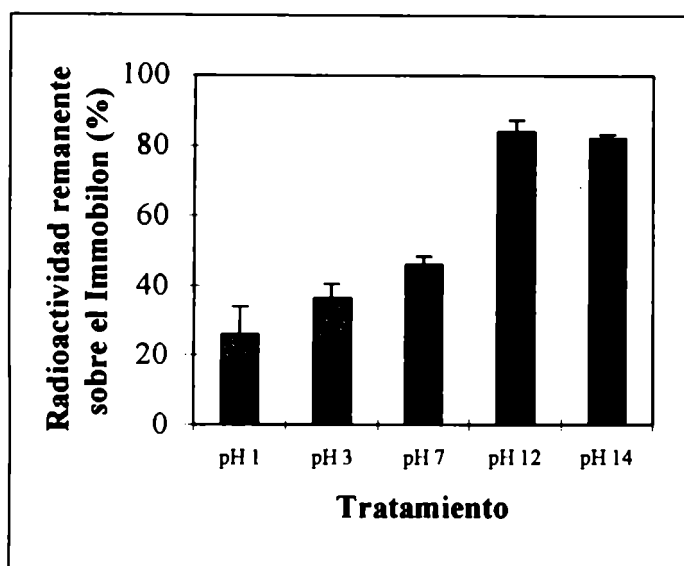


Figura R-16. Estabilidad de la NDP quinasa de *C. albicans* autofosforilada a la incubación a distintos pHs sobre membranas de Immobilon. La NDP quinasa se autofosforiló con ATP[γ ³²P], y se trató de acuerdo al protocolo utilizado por Muñoz-Dorado y col. (1993). En base a 4 experimentos diferentes, 15-30% de la radioactividad pareció ser estable a la incubación ácida.

Para corroborar la funcionalidad de este método, desarrollamos un control que se basa en la premisa que una metodología ideal debería ser capaz de eliminar el total de la radioactividad después de sucesivas incubaciones a pH ácido y alcalino. Es decir, si la radioactividad estable al ácido (15-30%) fuese realmente Ser-P, ésta debería liberarse con una posterior incubación a pH 14. A la inversa, la radioactividad estable al álcali debería hidrolizarse totalmente con una posterior incubación a pH 1. Sin embargo, esto no fue lo hallado. La radioactividad estable al ácido no fue liberada con la posterior incubación a pH alcalino, mientras que la radioactividad estable al álcali no fue hidrolizada totalmente por una posterior incubación a pH ácido (no se muestra). A su vez, la reincubación por 2 horas adicionales al mismo pH no mostró diferencias significativas.

Se realizaron experiencias agregando a los buffers 5% metanol. Con esta simple modificación metodológica, se hallaron los resultados que se muestran en la **figura R-17**. En este caso, el tratamiento consecutivo a los dos pH extremos, prácticamente eliminó el total de la radioactividad, verificando que el principio esencial de metodología es confiable, y que la autofosforilación es estable al álcali, por lo cual correspondería a His-P.

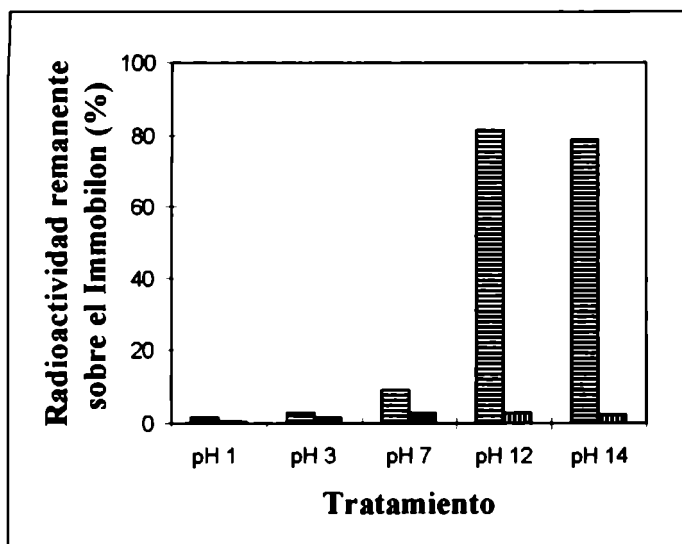


Figura R-17. Estabilidad de la NDP quinasa de *C. albicans* autofosforilada, sobre membranas de Immobilon. Variación metodológica: incubación en buffers con 5% metanol. Se realizó una incubación de 2 horas al pH indicado en la figura (barras rayadas diagonalmente); la radioactividad remanente sobre la membrana de Immobilon se incubó 2 horas más a pH 14 (barras negras), o a pH 1 (barras rayadas verticalmente). Prácticamente la totalidad de la radioactividad se liberó con las sucesivas incubaciones a pH 1 y 14.

4.1.2. Cinética de estabilidad de NDP quinasas autofosforiladas a distintos pHs, en solución

Se realizaron ensayos de estabilidad a pH 1, 7 y 14, con NDP quinasas autofosforiladas con $\text{ATP}\gamma^{32}\text{P}$ y aisladas como se describe en el ítem M-7.1. Los resultados se observan en la **figura R-18**. La NDP quinasa autofosforilada fue sensiblemente más inestable en los ensayos en solución a 45°C respecto de los realizados sobre membranas de Immobilon. En el caso de la incubación a pH 14, ésta tuvo una vida media de 1 hora, mientras que a pH 1 ésta fue de 2-3 minutos. A su vez, a pH 7 en solución, tuvo una vida media de 20 minutos.

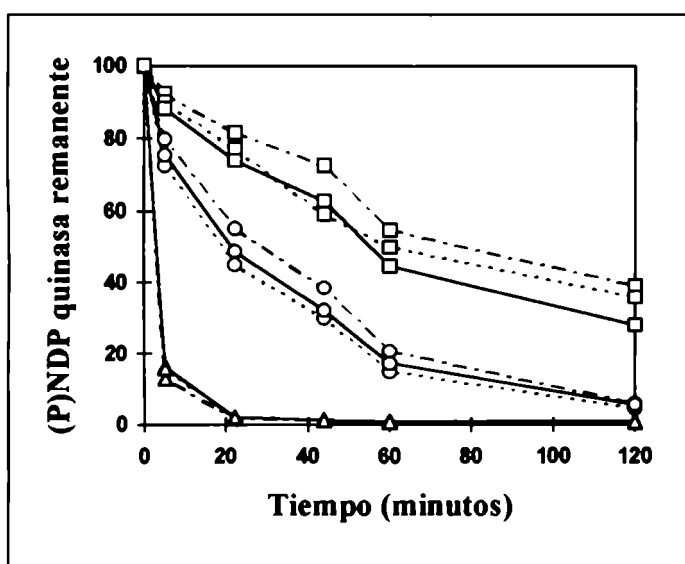


Figura R-18. NDP quinasa autofosforilada. Estabilidad en solución. Se estudió la estabilidad de la (P)NDP quinasa en solución a pH 1 (triángulos), pH 7 (círculos), y pH 14 (cuadrados). Las incubaciones se realizaron a 45°C sin agregados (línea continua), con 5% metanol (línea punteada), o con 5 mM Cl_2Mg (línea discontinua).

4.1.2.1. Efecto del metanol

El agregado de metanol en estos ensayos no produjo ninguna variación en la estabilidad de las especies fosforiladas en solución (ver **figura R-18.**), como tampoco tuvo efecto el agregado de Cl_2Mg .

Cuando se realizaron estos ensayos sobre Immobilon (ver ítem R-4.1.1.), el agregado de metanol tuvo un efecto importante sobre los porcentajes de radioactividad resistentes al ácido y al álcali y produjeron resultados confiables y reproducibles. Este efecto podría deberse, en teoría, o a una acción directa sobre la P-proteína o sobre la membrana de Immobilon.

El resultado observado con la P-proteína en solución, descarta que el metanol tenga efecto directo sobre la NDP quinasa.

Se concluye, entonces, que el mecanismo por el cual el metanol actúa en la metodología descrita sobre Immobilon es a través de un mejor embebido de la membrana por el solvente.

4.1.3. Hidrólisis ácida

La hidrólisis ácida fuerte tiene por finalidad determinar qué amino ácido (serina, treonina o tirosina) se encuentra fosforilado. La fosforilación en histidina no se detecta ya que es extremadamente lábil bajo esas condiciones.

Se estudió la presencia de Ser-P en NDP quinasa autofosforilada (ver ítem M-18.). Como producto de la hidrólisis ácida fuerte, se encontró la mayor parte de la radioactividad asociada a P_i , y una pequeña proporción asociada al estándar de Ser-P. Sin embargo, cuando se realizó previamente una incubación ácida en ClH 50 mM (en condiciones en que se libera la mayor proporción del fosfato unido a histidina) y luego se realizó la hidrólisis ácida fuerte, la cantidad de radioactividad asociada al estándar de Ser-P fue más de 100 veces menor.

Estos resultados indican que si bien es posible hallar Ser-P luego de la hidrólisis ácida fuerte (en concordancia con los estudios sobre las enzimas de *M. xanthus*, *E. coli* y humana; Muñoz-Dorado y col., 1993; MacDonald y col., 1993; Almaula y col., 1995), ésta sería debida a una transfosforilación química desde el residuo His-P a residuos de serina durante el tratamiento.

4.1.4. Integración parcial

Los resultados hallados indican que la enzima de *C. albicans* se autofosforila solamente en residuos de histidina. Las evidencias aportadas son las siguientes:

a- La enzima autofosforilada con $\text{ATP}\gamma^{32}\text{P}$ es capaz de ceder prácticamente la totalidad de la radioactividad a NDPs aceptores.

b- Los ensayos de estabilidad a distintos pHs, revelan que la estabilidad del complejo formado es estable a pH alcalino e inestable a pH ácido; a su vez, la pequeña proporción de NDP quinasa-P remanente luego de ceder el fosfato a un NDP aceptor también fue lábil a la incubación ácida y resistente a la alcalina.

c- La radioactividad asociada a Ser-P luego de las hidrólisis ácidas sería debido a transfosforilaciones durante el proceso de incubación a 110°C en CIH 6N.

En experimentos realizados utilizando las enzimas humanas y de *E. coli* (ver más adelante, ítem R-4.3.2.), se verificó que en estos casos la autofosforilación también es solamente en histidina.

A partir de la puesta a punto de las metodologías para discriminar entre la fosforilación en serina e histidina, se verificó que algunos de los métodos utilizados con anterioridad no son confiables y podrían haber llevado a conclusiones falsas. En particular, la metodología consistente en la fijación ácida del gel fue utilizada en algunos experimentos que llevaron a MacDonald y col. (1993) a correlacionar la fosforilación en serina *in vivo* con la inhibición de metástasis.

El agregado de 5% metanol a las soluciones utilizadas durante los estudios llevados a cabo sobre membranas de Immobilon, fue fundamental para la reproducibilidad de los ensayos. Las membranas de Immobilon son muy hidrofóbicas y podría haber proporciones variables de embebido correcto con el solvente entre distintos ensayos en ausencia de metanol. El agregado de metanol no altera la estabilidad del intermediario (P)NDP quinasa cuando el ensayo se realiza en solución. Por este motivo, se puede afirmar que estaría afectando el embebido de la membrana con el solvente. Dado que la estabilidad de la (P)NDP quinasa es mucho mayor sobre Immobilon (utilizando 5% metanol) que en solución, se podría predecir que mayores

concentraciones de metanol podrían disminuir aún más la vida media de las P-proteínas sobre Immobilon.

4.2. Estudio del efecto del Mg^{2+} sobre la autofosforilación

Se evaluó el efecto del Cl_2Mg sobre la autofosforilación. Para ello, la NDP quinasa autofosforilada con exceso de $ATP\gamma^{32}P$ bajo diferentes condiciones, se sembró en geles de poliacrilamida, los cuales se expusieron a placas de rayos X después de ser secados.

El efecto del Mg^{2+} sobre la autofosforilación se estudió no sólo por el agregado de cantidades conocidas de Cl_2Mg , sino también por el agregado de EDTA (quelante de iones divalentes). En la **figura R-19**, se muestra el efecto del Cl_2Mg sobre la autofosforilación de la NDP quinasa de *C. albicans* a 4°C en presencia de 1 mM EDTA. Se determinó que cuando la concentración de Mg^{2+} aumenta se produce una inhibición en la cantidad de NDP quinasa fosforilada.

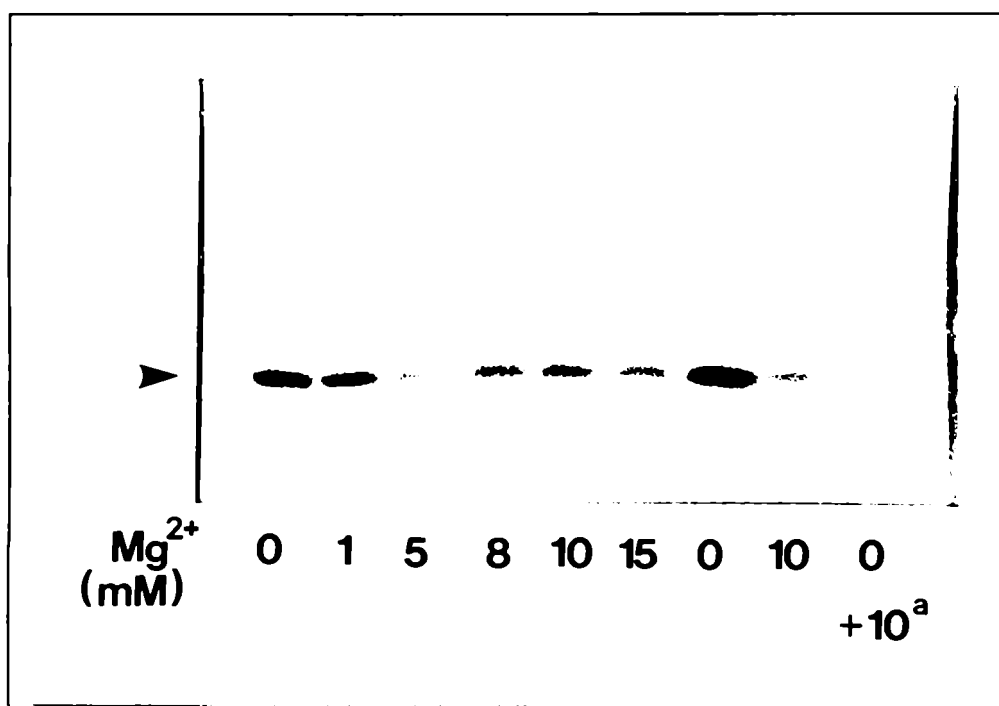


Figura R-19. Efecto del Mg^{2+} sobre la autofosforilación de la NDP quinasa. Se realizó el ensayo de autofosforilación con el agregado de cantidades crecientes de Mg^{2+} .

^a El agregado de Cl_2Mg se realizó sobre una muestra que fue incubada en su ausencia durante los 20 minutos de reacción; la incubación con Mg^{2+} se realizó durante 1 minuto adicional.

La menor fosforilación que se observa con el agregado de Mg^{2+} , podría deberse a diferentes factores: **a-** inhibición de la autofosforilación, **b-** mayor actividad ATPasa - defosforilación, liberando P_i al agua-, o bien **c-** a una variación en el equilibrio de la autofosforilación -que lleva a tener menos enzima autofosforilada en un dado instante-.

a- En la **figura R-19**. (última calle) se observa que el agregado de Mg^{2+} durante sólo 1 minuto previo a detener la incubación da igual disminución de la autofosforilación que cuando está presente durante todo el tiempo, sugiriendo que no se debería a un proceso de inhibición de la autofosforilación. Apoyando a este resultado, se confirmó que el agregado de cantidades crecientes de Mg^{2+} no inhibe significativamente la reacción enzimática total (mediciones realizadas por el método directo); pero su presencia fue indispensable para medir actividad enzimática (no se muestra). Si el Mg^{2+} inhibiera la primera etapa de la reacción, debería inhibir por consecuencia la reacción total. Se concluye, entonces, que la disminución en la autofosforilación por el agregado de Mg^{2+} no es debido a la inhibición de su autofosforilación.

b- En los experimentos con la NDP quinasa soluble (ver ítem R-4.1.2.), se verificó que el Mg^{2+} no aumenta la defosforilación.

Los resultados obtenidos están de acuerdo con la hipótesis **c-**, y podría afirmarse que el Mg^{2+} actúa variando el equilibrio de la autofosforilación.

4.2.1. Autofosforilación en extractos crudos de *C. albicans* y *E. coli*

Siguiendo los lineamientos del en el ítem R-4.2., se autofosforiló la NDP quinasa en extractos crudos de *C. albicans* utilizando concentraciones bajas de Mg^{2+} -producto de la presencia elevada de EDTA (10 mM)- y se estudió el efecto de concentraciones crecientes de Mg^{2+} . En la **figura R-20**., se observa claramente que en el caso en que no se agregó Cl_2Mg , la fosforilación fue menor a los casos en que se agregaron concentraciones bajas; este hecho indica que se necesitan cationes divalentes (por ejemplo Mg^{2+}) para la formación del intermediario de la reacción; resultados similares se obtuvieron con la enzima de *E. coli* purificada (no se muestra). Estos resultados difieren de los hallados por Williams y col. (1993), quienes describieron recientemente que la NDP quinasa de *M. xanthus* era capaz de autofosforilarse en ausencia de cationes divalentes. Concentraciones de Cl_2Mg mayores que la concentración de EDTA produjeron nuevamente una disminución en la auto-fosforilación (como se ha observado

utilizando la enzima pura - ver la figura R-19. -). Las condiciones óptimas de autofosforilación de la NDP quinasa de *C. albicans* en extractos crudos fue utilizando 0,5 mM Cl_2Mg y 10 mM EDTA. Bajo estas condiciones, se estudió si otras proteínas se fosforilan con concentraciones crecientes de ATPs (ver **figura R-21.**). Nuevamente, la única proteína fosforilada bajo estas condiciones fue la NDP quinasa. A su vez, cuando los experimentos se realizaron utilizando GTP en lugar de ATP, se observó la misma única banda fosforilada (experimentos no mostrados). El agregado de Mg^{2+} y TDP produjo la defosforilación de la banda (no se muestra), comprobando que efectivamente se trata del intermediario de alta energía.

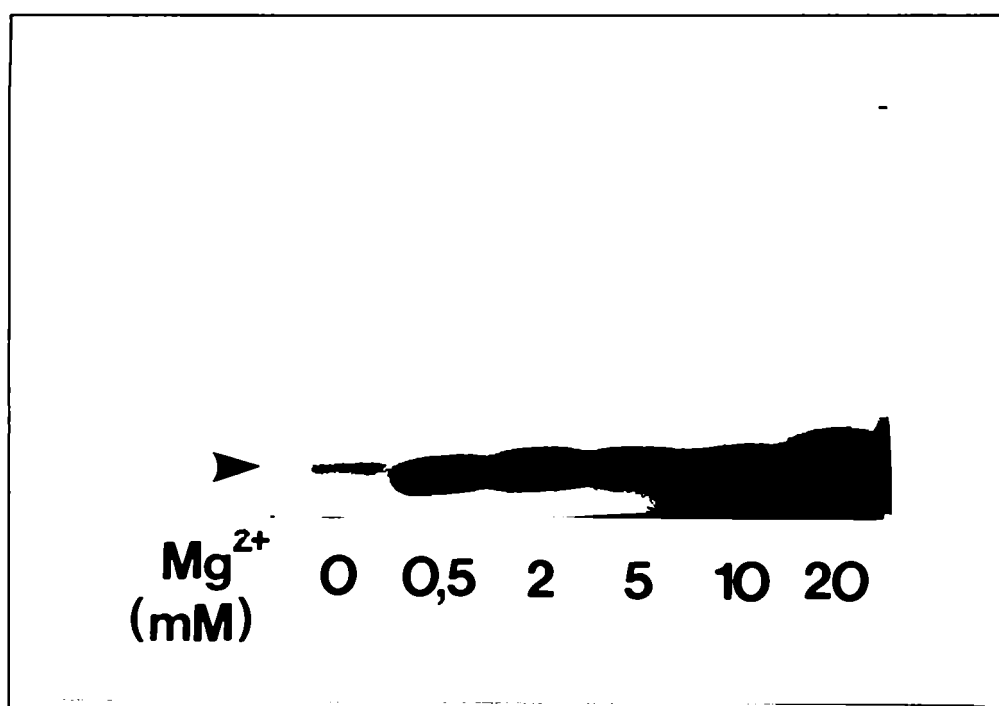


Figura R-20. Autofosforilación de la NDP quinasa en extractos crudos de *C. albicans*. Efecto del Mg^{2+} . Se incubaron extractos crudos de *C. albicans* en condiciones de alta concentración de EDTA (10 mM), y se evaluó el efecto de concentraciones crecientes de Mg^{2+} sobre la autofosforilación. La incubación se realizó durante 5 minutos a 4°C.

Se realizó una curva de tiempo de autofosforilación con $\text{ATP}\gamma^{32}\text{P}$ en extractos crudos de *C. albicans* (ver **figuras R-22.**). A tiempos cortos, la NDP quinasa fue la única proteína fosforilada, sin embargo, al cabo de 1 hora de incubación a 4°C, se observó otra banda de aproximadamente 34 kDa (**figura R-22.**). Cuando el buffer de incubación incluyó 100 mM ClK, se observaron, al cabo de 1 h, otras proteínas, más débilmente fosforiladas, además de las dos ya observadas (**figura R-22.**).

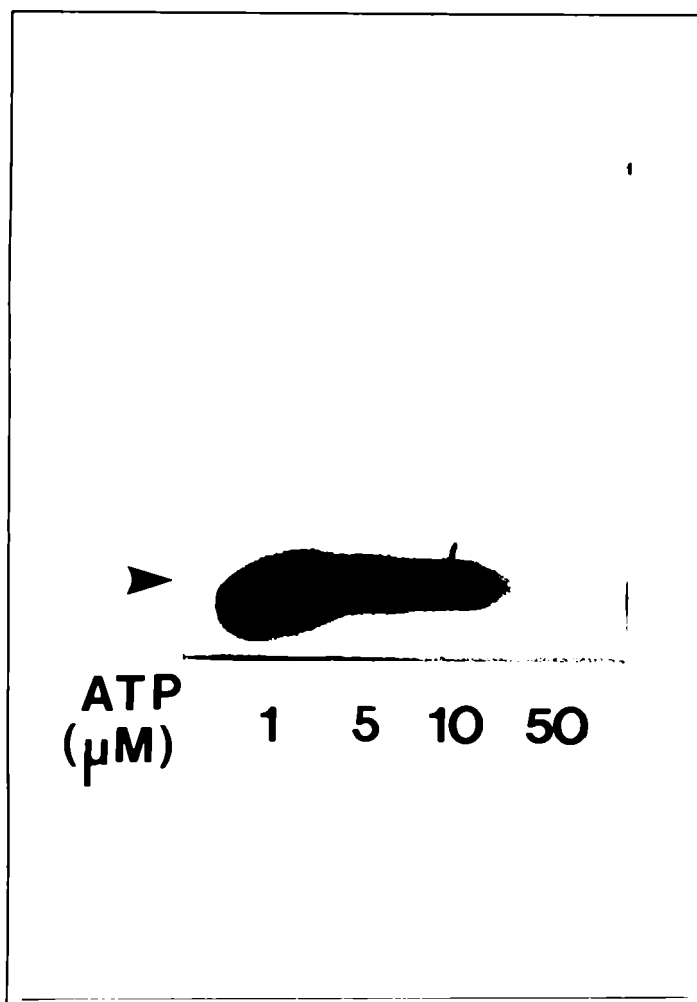


Figura R-21. Efecto de concentraciones crecientes de ATP sobre el perfil de proteínas fosforiladas en extractos crudos de *C. albicans*.

En condiciones de baja concentración de Mg^{2+} , (0.5 mM Cl_2Mg , 10 mM EDTA). Se estudió el perfil de proteínas fosforiladas al aumentar las concentraciones de ATP. La incubación se realizó durante 5 minutos a 4°C. La flecha señala a la NDP quinasa.

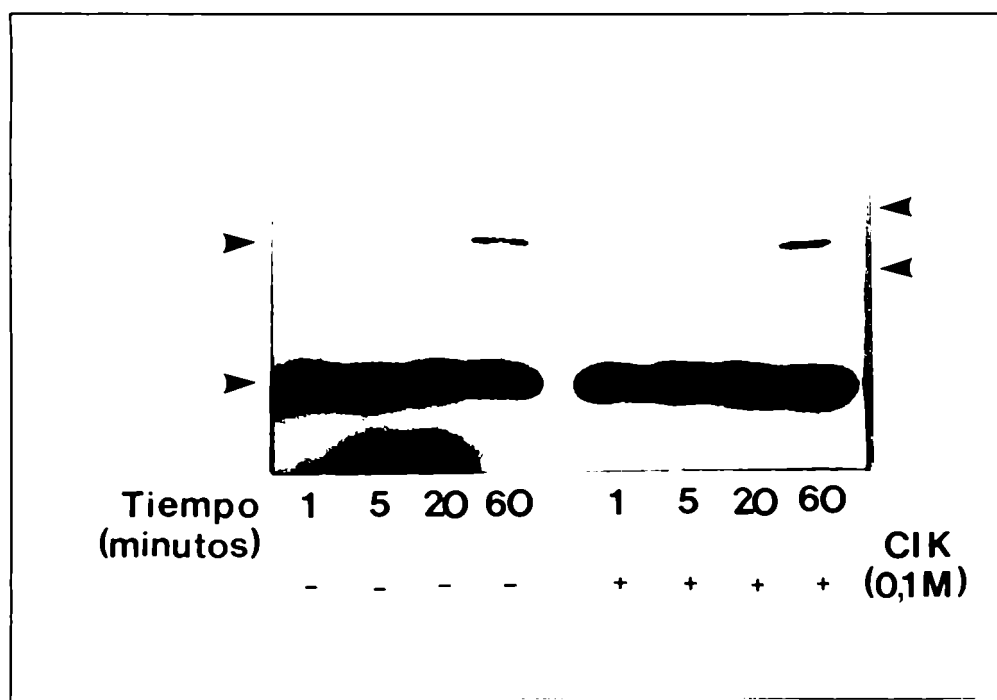


Figura R-22. Cinética de autofosforilación en extractos crudos de *C. albicans*. Las flechas de la derecha muestran dos bandas muy débilmente fosforiladas.

Cuando se realizaron los ensayos con extractos de *E. coli*, se halló a la NDP quinasa fosforilada, junto a otra proteína de aproximadamente 34 kDa (ver **figura R-23.**).

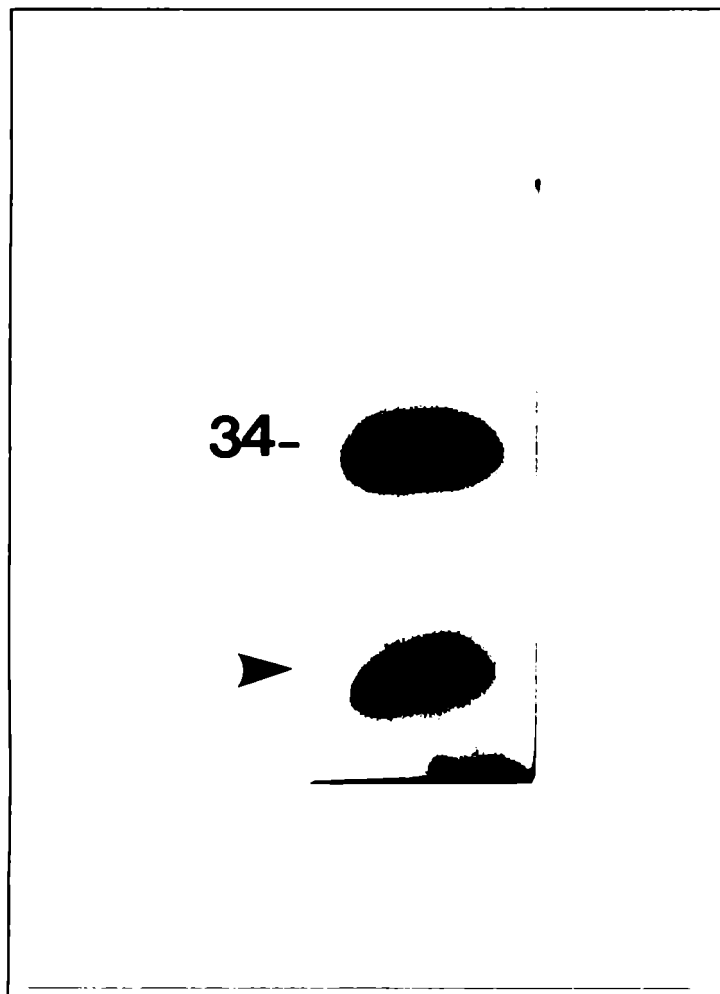
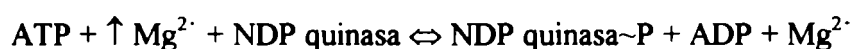
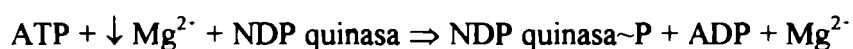


Figura R-23. Fosforilación en extractos crudos de *E. coli*. Las condiciones fueron las mismas a las utilizadas para la fosforilación de la NDP quinasa de *C. albicans* en extractos crudos. La flecha inferior muestra la ubicación de la NDP quinasa.

4.2.2. Integración parcial

Se caracterizó la autofosforilación de la NDP quinasa en relación al Mg^{2+} . Bajo ciertas condiciones (0,5 mM Cl_2Mg , 10 mM EDTA), se logró una óptima fosforilación tanto de la NDP quinasa purificada como de la proveniente de extractos crudos. Se verificó que experimentalmente este ion divalente varía el equilibrio de la fosforilación, de manera tal que, en la práctica, las ecuaciones se ven modificadas de la siguiente manera en base a la concentración de Mg^{2+} :



Las NDP quinasas cristalizadas hasta el momento no poseen un sitio de unión al Mg^{2+} ; el Mg^{2+} sólo forma uniones con el NDP entre el fosfato α y β , dándole una conformación espacial característica. La NDP quinasa de *M. xanthus* ha sido cristalizada complejada a ADP en presencia y en ausencia de Mg^{2+} .

En estudios clásicos para develar el mecanismo de acción de las NDP quinasas se identificó al $ATP \cdot Mg^{2+}$ y al $ADP \cdot Mg^{2+}$ como los verdaderos sustratos de la reacción (Garces y Cleland, 1969).

Un modelo capaz de explicar esta característica de la autofosforilación y defosforilación inducida por Mg^{2+} podría ser el siguiente:

Si el ATP tuviera una conformación suficientemente diferente del $ATP \cdot Mg^{2+}$, como para que el primero no pueda entrar en el sitio activo, la presencia ínfima de Mg^{2+} formará $ATP \cdot Mg^{2+}$, y será capaz de servir de sustrato para la autofosforilación de la proteína (sin competencia del ATP por el sitio activo). Sin embargo, una vez formado el complejo (P)NDP quinasa, el ADP formado será minoritario y tendrá muy pocas posibilidades de unir Mg^{2+} ; a su vez, el ADP libre será capaz de entrar en el sitio activo, rindiendo un complejo inactivo en ausencia de Mg^{2+} . Sólo con cantidades crecientes de Mg^{2+} se formará suficiente complejo $ADP \cdot Mg^{2+}$ como para competir con el ADP libre por el sitio activo y permitiendo así que ocurra la reacción inversa.

Los ensayos de autofosforilación en extractos crudos muestran que en *C. albicans* no hay otras proteínas que se autofosforilen con igual rapidez que la NDP quinasa bajo las condiciones utilizadas. A tiempos largos, se pueden observar otra proteína fosforilada y con el agregado de ClK se pueden observar aún otras.

En *E. coli*, se puede observar un comportamiento diferente. En extractos crudos, juntamente con la NDP quinasa, se autofosforila intensamente otra proteína de aproximadamente 34 kDa.

En base a estos hallazgos, se puede pensar que una estrategia para el clonado de la NDP quinasa de *C. albicans* (y posiblemente de otros organismos eucariotas) se podría realizar a partir de bibliotecas de expresión bajo las condiciones de incubación aquí descriptas.

4.3. Estudios de fosforilación de NDP quinasas *in vivo* y por proteína quinasa CK2

4.3.1. Fosforilación de NDP quinasa de *C. albicans* con proteína quinasa CK2 recombinante humana

La fosforilación de la NDP quinasa de *C. albicans* se realizó bajo las condiciones de fosforilación descritas por Engel y col. (1994) con la CK2 recombinante humana cedida por el Prof. Issinger. Se comprobó la total dependencia de polilisina para su efectiva fosforilación por CK2 (ver **figura R-24.**). Se observa nuevamente que hay una disminución en la autofosforilación por el agregado de Mg^{2+} , y potenciado con éste, una disminución mayor con el agregado de ClNa y polilisina.

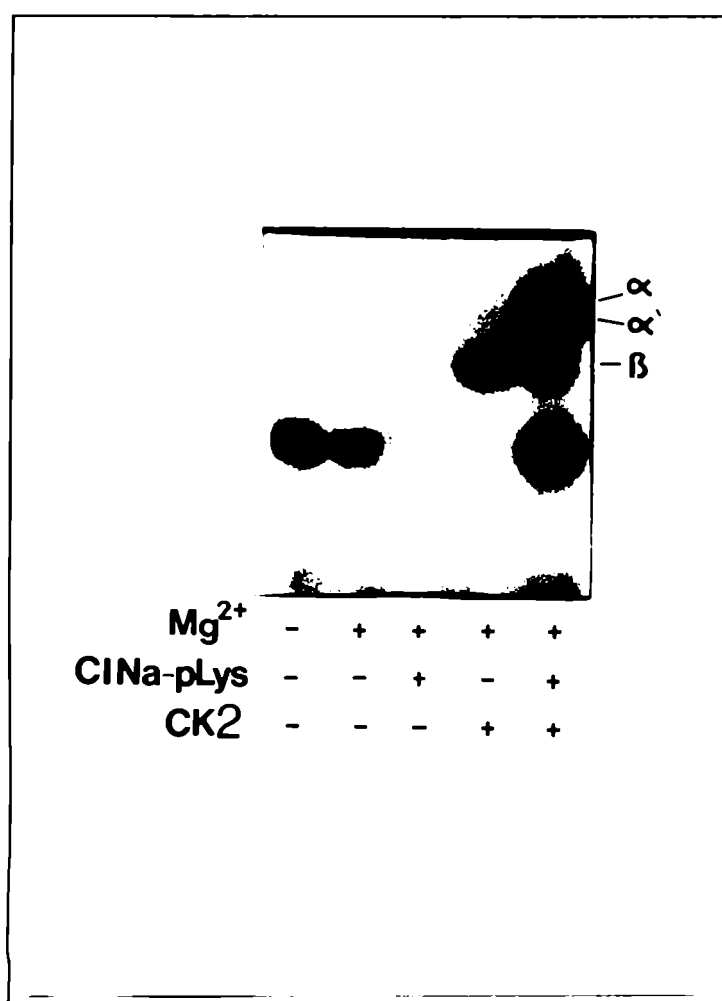


Figura R-24. Fosforilación de la NDP quinasa de *C. albicans* por la proteína quinasa CK2 recombinante humana. El ensayo de fosforilación se realizó como se detalla en el ítem M-17. con la NDP quinasa de *C. albicans* purificada. Se muestra la ubicación de las subunidades de CK2 fosforiladas.

4.3.2. Cinética de estabilidad de las distintas especies fosforiladas a distintos pHs.

Para verificar la utilidad de la metodología descrita en el ítem R-4.1.1. (con el agregado de 5% de metanol) se autofosforiló la proteína quinasa CK2, holoenzima

recombinante humana. Producto de su autofosforilación, las subunidades α , α' y β son fosforiladas en residuos serina o treonina (ver la **figura R-24.**); la subunidad β se autofosforiló en ausencia de polilisina, mientras las subunidades α se autofosforilaron en su presencia (Boldyreff y col. 1994).

Se realizaron cinéticas de defosforilación en buffers a pH 1 y 14 sobre Immobilon (ver **figura R-25.**). Se desprende claramente del gráfico que esta fosforilación fue estable a pH 1 e inestable a pH 14, tal cual lo esperado. Al cabo de las 2 horas estudiadas, se incubaron las membranas de Immobilon 2 horas más al pH extremo opuesto. Se verificó que la radioactividad residual a pH 14 en todos los casos era estable al pH 1 durante las 2 horas adicionales, mientras que la radioactividad estable a pH 1 durante las primeras 2 horas de incubación, fue liberada a pH 14 en la misma magnitud en que había sido liberada a este pH durante las primeras 2 horas.

En un ejemplo concreto, como se observa en la **figura R-25. A**, en el caso de la subunidad α , la radioactividad remanente luego de las primeras 2 horas de incubación a pH 14 fue de aproximadamente 20 %; esta radioactividad se mantuvo constante al ser incubada durante 2 horas adicionales a pH 1. Cuando se evaluó la estabilidad a pH 1, aproximadamente un 98 % fue estable al cabo de 2 h; cuando esta membrana de Immobilon se volvió a incubar 2 horas adicionales a pH 14 se liberó radioactividad hasta quedar el 20 %.

Se concluye que la radioactividad remanente luego de las 2 primeras horas de incubación a pH 14 todavía se debe a residuos serina o treonina fosforilados; la radioactividad remanente se debe a la cinética de defosforilación diferencial entre las proteínas estudiadas.

La cinética de defosforilación se realizó también sobre la NDP quinasa de *C. albicans*, humana (A y B) y de *E. coli*, autofosforiladas (**figura R-25. B**).

Los resultados fueron opuestos a los obtenidos con las subunidades de la CK2, es decir, estables a pH alcalino e inestables a pH ácido. De los controles realizados incubando al pH extremo opuesto luego de las 2 primeras horas de incubación se puede concluir que la única especie fosforilada detectable es estable al álcali e inestable al ácido. Dado que hemos observado que la especie fosforilada es capaz de ceder el fosfato a nucleótidos aceptores, concluimos que se trata de la fosforilación en histidina del sitio activo.

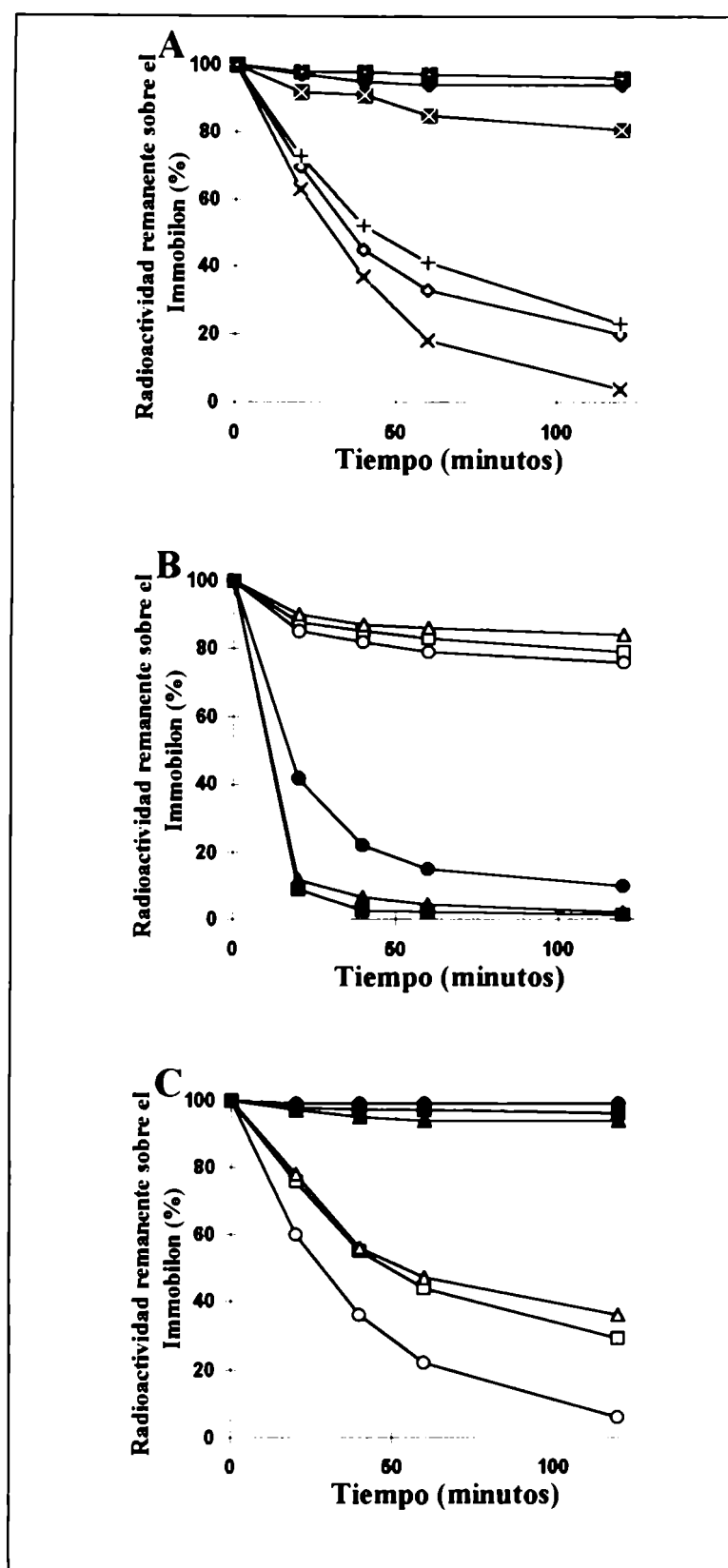


Figura R-25. A, B y C. Estabilidad a pH 1 y 14 de distintas especies fosforiladas, sobre membranas de Immobilon. Las proteínas fosforiladas, fueron incubadas sobre membranas de Immobilon a pH 1 (símbolos llenos) o a pH 14 (símbolos vacíos). **A-** Las subunidades de la proteína quinasa CK2, α (+), α' (rombo) y β (x); **B-** NDP quinasas humanas A y B (triángulos), de *E. coli* (cuadrados), y de *C. albicans* (círculos), autofosforiladas. **C-** NDP quinasas humanas, *E. coli* y *C. albicans*, fosforiladas por proteína quinasa CK2.

Con estos resultados, hemos confirmado que la autofosforilación es en histidina no sólo en la NDP quinasa de *C. albicans*, sino también en la enzimas de otras especies donde se había descripto una gran cantidad de autofosforilación en serina (Muñoz-Dorado y col., 1990; MacDonald y col., 1993; Almaula y col., 1995). Los resultados obtenidos por estos grupos, posiblemente no sean ciertos debido a una metodología inadecuada para distinguir Ser-P en una proteína con una gran proporción de His-P.

En cuanto a la estabilidad a pHs extremos de diversas NDP quinasas fosforiladas por CK2, los resultados obtenidos se muestran en la **figura R-25. C**. La fosforilación es característica de Ser/Thr-P y por lo tanto se desprende que en las condiciones en que se realizó la fosforilación por CK2 no hay autofosforilación detectable en residuos de histidina.

Este resultado podría explicarse por la disminución de la autofosforilación debido a las condiciones de Mg^{2+} , polilisina y ClNa; pero como se verá más adelante, podría estar influenciado por el hecho que la NDP quinasa fosforilada por CK2 pierde la capacidad de autofosforilarse.

4.3.3. Estudio de fosforilación *in vivo* de las NDP quinasas de *C. albicans* y humanas

La fosforilación de la NDP quinasa *in vivo* se buscó en células de *C. albicans* bajo las condiciones de crecimiento que se detallan en el ítem M-19. Bajo estas condiciones se observó fosforilación *in vivo* de la NDP quinasa; sin embargo, la fosforilación observada fue estable al álcali e inestable al ácido, por lo cual se concluye que la proteína se halla fosforilada en histidina y no en serina (ver **figura R-26**).

El hecho que se haya encontrado fosforilación en histidina significa que al menos en algún momento del ciclo celular el “steady state” de la reacción *in vivo* involucra una apreciable cantidad de intermediario de reacción de alta energía. Es de hacer notar que ésta es la primera vez que se detecta sin ambigüedad el intermediario de alta energía. Recientemente, Timmons y col. (1995) describieron la presencia del intermediario en extractos de *Drosophila* en base a multiplicidad de bandas encontradas por isoelectroenfoque.

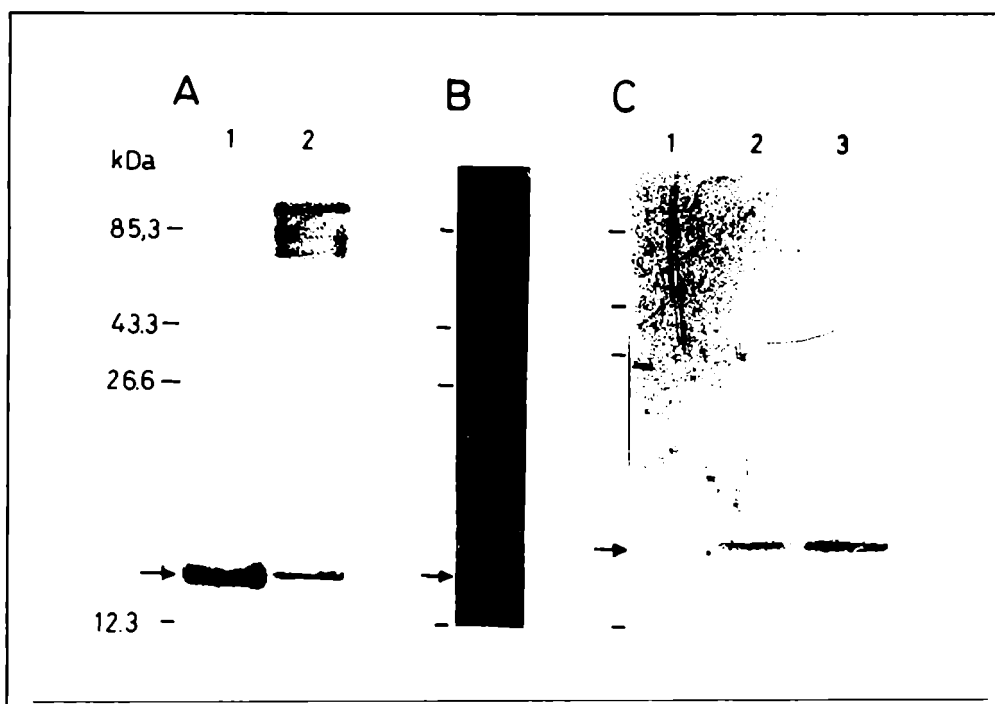


Figura R-26. Fosforilación *in vivo* de la NDP quinasa de *C. albicans*. Se crecieron células de *C. albicans* en un medio definido (A-B) o en un medio rico de bajo fosfato (C) como se describió en el ítem M-19. A-B, las células se hirvieron con buffer de Laemmli, se separaron en SDS-PAGE, y se transfirieron a membranas de Immobilon. A- Western-blot; calle 1, NDP quinasa pura autofosforilada; calle 2, fosforilación *in vivo*. B- Autorradiografía de la calle 2. C- Se realizaron extractos celulares con inhibidores de fosfatasas, se inmunoprecipitó la NDP quinasa (como se describe en el ítem M-19.1.), se separó en SDS-PAGE y se transfirieron las proteínas a membranas de Immobilon. La membrana se cortó separando 3 calles con igual cantidad de proteína. Éstas se incubaron en buffers pH 1 o 14 (calles 1 y 2), o no se trató (calle 3); luego fueron expuestas a placas de rayos X.

El hecho de no encontrar a la NDP quinasa de *C. albicans* fosforilada *in vivo* en un residuo de serina, no necesariamente implica que ésta no exista. Sólo que bajo las condiciones estudiadas ésta no fue hallada en una proporción importante respecto de la fosforilación en histidina.

4.3.4. Fosforilación *in vivo* de la NDP quinasa humana

La fosforilación *in vivo* de células HeLa, la preparación de extractos y la inmunoprecipitación de las NDP quinasas se realizó como se describe en el ítem M-19.

Se inmunoprecipitó la proteína, y una parte se incubó con Cl_2Mg y exceso de TDP a temperatura ambiente durante 5 minutos. Las muestras se separaron en SDS-PAGE 15% y las proteínas se transfirieron a membranas de Immobilon para la realización del estudio de estabilidad a diferentes pHs.

Como se muestra en la **figura R-27.**, la proteína inmunoprecipitada consta básicamente de tres bandas radioactivas. Dos de ellas (NDP quinasa A y B, en la figura señaladas como a y c) se encuentran autofosforiladas en histidina (se defosforilan con el agregado de TDP y son estables al tratamiento alcalino). La tercera banda (en la figura R-27., b), estable a pH ácido, corresponde a NDP quinasa B fosforilada en serina, ya que fue reconocida en Western-blots con anticuerpos específicos contra esta subunidad (ensayo realizado por el Dr. M. Engel). El corrimiento de las bandas de proteínas al estar fosforiladas es una característica muy general. La NDP quinasa B fosforilada por CK2 *in vitro* también produce un cambio de movilidad de similares características. Por el contrario, la autofosforilación en histidina no produce cambios de movilidad aparente en ninguna NDP quinasa estudiada en el laboratorio.

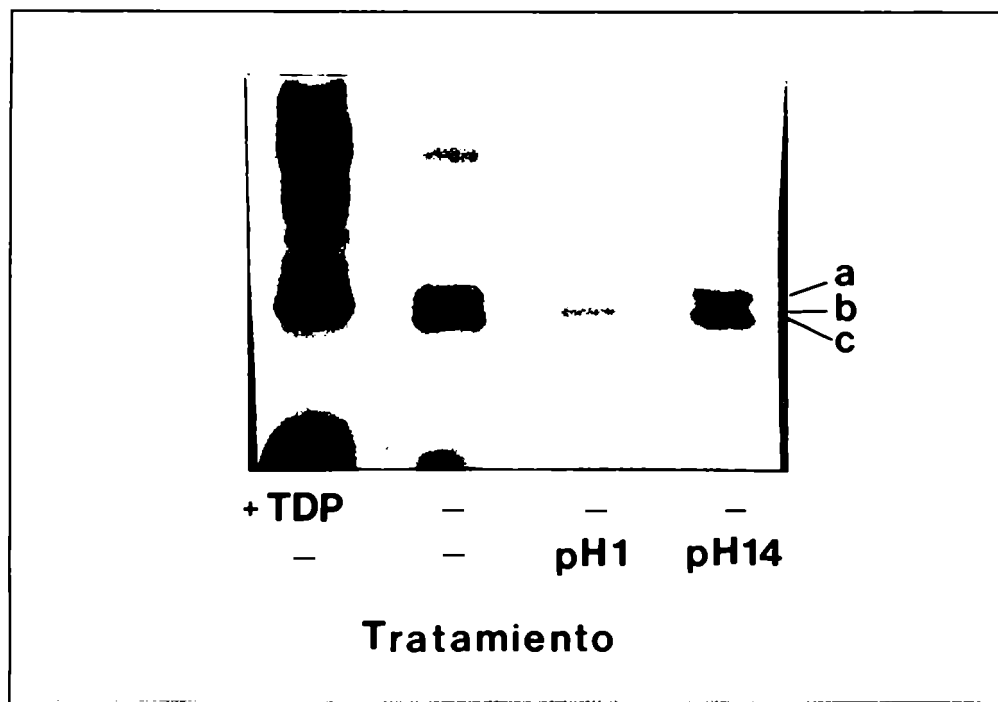


Figura R-27. Fosforilación *in vivo* de la NDP quinasa humana en células HeLa. Se realizaron cultivos celulares, extractos, y se inmunoprecipitó la NDP quinasa como se describe en el ítem M-19. Tres alícuotas idénticas de éste se separaron en SDS-PAGE; una cuarta alícuota del inmunoprecipitado se resuspendió en buffer con 5 mM Cl_2Mg y 10 mM TDP, se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y se sembró en el mismo gel. Las proteínas se transfirieron luego a una membrana de Immobilon, se recortó, y las distintas partes se incubaron en los buffers descriptos (con 5% metanol) a los pHs indicados, o no fueron tratados. Se identifican 3 bandas fosforiladas (a, b y c).

4.3.5. Efecto de la fosforilación por CK2 sobre la actividad de la NDP quinasa A humana

Se estudió el efecto de la fosforilación por CK2 sobre la actividad NDP quinasa. El modelo utilizado para el estudio fue CK2 recombinante humana y NDP quinasa A recombinante humana. Las razones para la elección de estas enzimas tienen que ver con la importancia adscrita a la fosforilación *in vivo* de la NDP quinasa en el modelo humano y a que la fosforilación por CK2 *in vitro* ya había sido bien descrita (Engel y col., 1994), con 0,8 moles de fosfato incorporados por subunidad de NDP quinasa A (valor superior al máximo estimado para la enzima de *C. albicans*).

Para este estudio, se muestra un ensayo donde se realizó una cinética de fosforilación y se tomaron alícuotas a los distintos tiempos para el ensayo de actividad enzimática. Como control, se realizaron incubaciones paralelas en ausencia de CK2 como única diferencia.

Los resultados de la medida de actividad se muestran en la **figura R-28**. Se observa claramente una disminución en la actividad de la NDP quinasa a medida que transcurre la reacción de fosforilación. No se observan estas diferencias en los controles que no fueron fosforilados. Es decir, la fosforilación de la NDP quinasa A por CK2 produce una importante inhibición de su actividad enzimática.

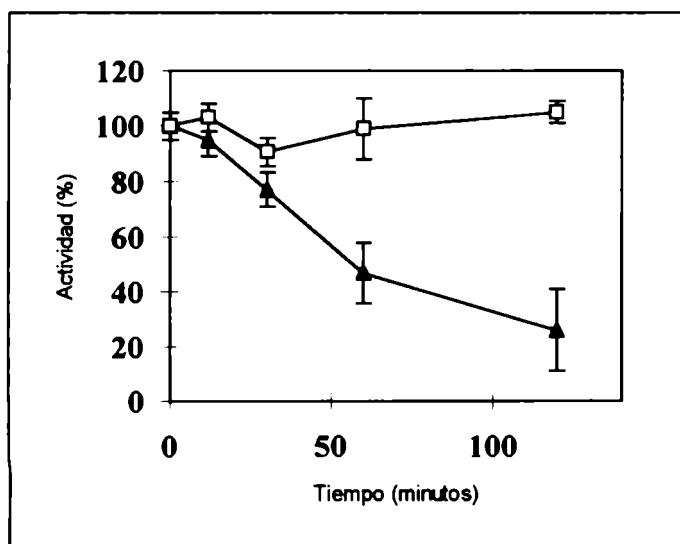


Figura R-28. Efecto de la fosforilación por CK2 sobre la actividad enzimática de la NDP quinasa A humana. La NDP quinasa recombinante humana se incubó a 37°C en condiciones de fosforilación por CK2 en presencia (triángulos) o ausencia (cuadrados) de CK2 holoenzima recombinante humana. Luego del tratamiento, cada alícuota fue microdializada contra una solución saturada de sulfato de amonio, hasta el momento de ser medida su actividad. La medida de actividad se realizó por sextuplicado por el método con una enzima acoplada.

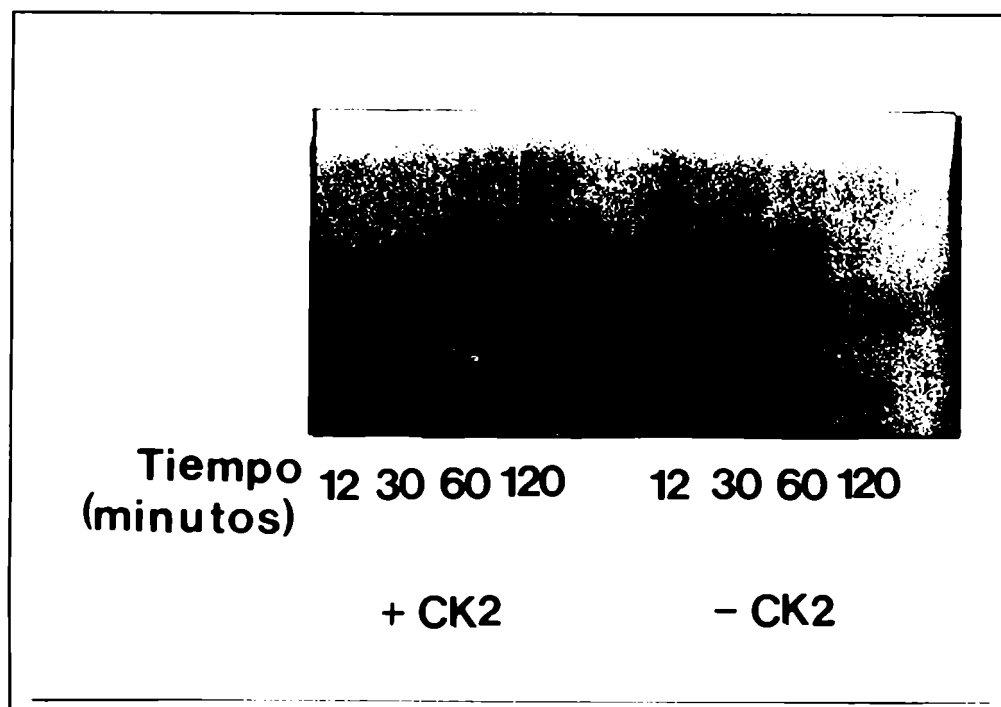


Figura R-29. Autofosforilación de la NDP quinasa humana A, a distintos tiempos de la fosforilación por CK2. Una fracción de cada tiempo estudiado de fosforilación *in vitro* por CK2 (y de los controles sin CK2), se incubó en condiciones de autofosforilación con exceso de ATP [$\gamma^{32}\text{P}$].

En la **figura R-29**, se muestra un ensayo donde la proteína con diferentes grados de fosforilación se puso en condiciones de autofosforilación. La fosforilación por CK2 inhibió la autofosforilación de la NDP quinasa.

Estos resultados indican claramente que la fosforilación por CK2 *in vitro* produce una disminución de la actividad NDP quinasa y que ésta estaría dada por la imposibilidad de cumplir la primera etapa de la reacción que cataliza, su autofosforilación.

Según estudios realizados por Engel y col (1994) sobre la fosforilación de NDP quinasa A, ésta podría ser en la Ser 122 ó 124. Estos residuos están muy conservados en las NDP quinasas y particularmente están presentes en la NDP quinasa de *C. albicans* (ver **figura R-4**).

La NDP quinasa B humana se encuentra cristalizada y tiene 88% de identidad con la NDP quinasa A. Se observa en la **figura 30** una representación de la estructura de la NDP quinasa B donde se muestra en la parte A cómo el oxígeno en posición épsilon de la serina 120 y 122 se encuentran accesibles desde el exterior de la molécula sin necesidad de ningún cambio conformacional. Se observa a su vez, que se encuentran en zonas de amino ácidos ácidos, aunque también hay argininas en la cercanía.



Figura R-30. Estructura espacial de una subunidad de la NDP quinasa B humana.

La estructura de la NDP quinasa B se estudió mediante el uso del programa RasMol, en base a la estructura obtenida a partir de la difracción por rayos X de los cristales (Williams y col., 1995). Se muestra en color verde las serinas 120 y 122; en color amarillo los amino ácidos ácidos, y en color celeste los básicos. En ambas serinas, el átomo O γ es identificable desde el exterior de la molécula utilizando la forma "space fill", como se muestra.

4.3.6. Integración

Si bien se ha asignado a las NDP quinasas diversas funciones, tales como inhibición de metástasis, actividad estimuladora de la transcripción del oncogen *c-myc* (factor PuF), un papel importante en el desarrollo de *Drosophila*, etc., no se sabe con claridad de qué manera podrían estar cumplimentando estas funciones. No se ha encontrado, por ejemplo, una correlación entre la actividad NDP quinasa y la inhibición de la metástasis. La capacidad de unión a ADN y la activación de la transcripción *in vitro*, no precisa de actividad enzimática, y ésta no funciona con "todas" las preparaciones de enzima (según ensayos realizados en el Instituto Pasteur). Cuando se purifica el factor PuF a partir de extractos nucleares, éste eluye de una columna de DEAE con 0,4 M ClNa, que no se condice con un pI de 9,1 de la NDP quinasa B humana.

Steeg y col. han tratado de correlacionar la fosforilación de la NDP quinasa en serina con la inhibición de la metástasis (MacDonald y col, 1993).

En cuanto a la actividad de unión a ADN, según Postel y col. (1993), se propone que la unión se ve favorecida por la presencia de otro factor, disparador.

Otras investigaciones, han descripto a la NDP quinasa como quinasa de proteínas (Engel y col., 1995).

La fosforilación reversible de proteínas, es uno de los mecanismos conocidos a través de los cuales se puede controlar la actividad proteica en células de distintos orígenes.

En el presente trabajo, decidimos estudiar en profundidad la posibilidad de la autofosforilación en serina (postulada por MacDonald y col., 1993, Muñoz-Dorado y col. 1993 y Almaula y col. 1995), la fosforilación por CK2, recientemente encontrada por Engel y col. (1994) y su efecto sobre la actividad enzimática; a su vez, buscamos si era posible encontrar a la enzima fosforilada *in vivo*.

Una posible fosforilación por CK2 podría explicar el comportamiento cromatográfico de la NDP quinasa B purificada con actividad de unión a ADN. También podría aclarar algunos aspectos de la regulación de la enzima y desarrollar posibles estrategias para abordar un conocimiento más completo sobre la función de las NDP quinasas.

Se puso a punto la detección de residuos de P-Ser y P-His, y su discriminación sobre membranas de Immobilon. Para que la metodología sea confiable, se debe agregar en los buffers, una concentración de 5 % metanol (**figura R-17.**). En base a los estudios sobre la P-NDP quinasa en solución, el intermediario de alta energía resultó ser entre 3 y 6 veces más sensible al tratamiento de pH y temperatura que la enzima sobre el Immobilon; el metanol, por otra parte, no actuó sobre la proteína en sí (**figura R-18.**), mejorando sí el acceso del buffer al sitio activo. Se propone que el agregado de metanol 5% favorece el embebido, y que mayores cantidades de metanol en los buffers disminuiría la estabilidad de los residuos fosforilados asemejándose a lo que ocurre con la enzima soluble.

Mediante los estudios de autofosforilación (ítem R-4.1.), se concluyó que no existe autofosforilación en serina en la NDP quinasa de *C. albicans*. Se propone, por otro lado, que la Ser-P hallada luego de la hidrólisis ácida (6 N ClH a 110°C, durante 1 h) tanto por otros autores (Muñoz-Dorado y col., 1993; MacDonald y col., 1993; Almaula y col., 1995), como por nosotros mismos, no sería mas que una transfosforilación química desde His~P de alta energía, a serinas cercanas. Es decir, el

hallazgo de Ser-P luego del tratamiento en estas condiciones extremas, no sería mas que un artificio producto de la gran cantidad de His~P en estas preparaciones.

La autofosforilación de la NDP quinasa de *C. albicans* se estudió en presencia o ausencia de Mg^{2+} (**figura R-19.**). Los resultados muestran que existe una disminución de la autofosforilación en las dos condiciones extremas, exceso de EDTA y cantidades crecientes de Mg^{2+} . Cuando se estudió este efecto más en profundidad, se determinó que el efecto del Mg^{2+} agregado no se debió a una exacerbación de la actividad ATPasa sino posiblemente a una variación del equilibrio de la reacción, en donde la cantidad de proteína autofosforilada se ve disminuida.

Si bien a concentraciones muy altas de EDTA (10 mM) se observó inhibición de la autofosforilación, con agregado de Mg^{2+} en una concentración 0,5 mM la autofosforilación fue óptima. A estas concentraciones de Mg^{2+} , la actividad NDP quinasa no ha sido medible. Concluimos, que posiblemente a concentraciones muy bajas de Mg^{2+} , la reacción enzimática puede proceder sólo hasta el primer paso, la autofosforilación. Para que pueda continuar la reacción, se necesitarían concentraciones de Mg^{2+} mucho más elevadas. Es decir, mediante la variación de las concentraciones de Mg^{2+} , se puede detener la reacción total sin detener la autofosforilación. Utilizando este nuevo concepto, realizamos autofosforilaciones en extractos crudos de *C. albicans*. A tiempos cortos a 4°C, la NDP quinasa fue la única proteína fosforilada. A tiempos más largos, y con el agregado de ClK, se pueden distinguir otras bandas.

La NDP quinasa de *C. albicans* fue fosforilada *in vitro* por la proteína quinasa CK2 recombinante humana (**figura R-24.**). El estudio aquí expuesto fue realizado con la holoenzima, es decir, con subunidades α , α' y β . Las características de su fosforilación son similares a aquellas estudiadas previamente por Engel y col. para las NDP quinasas humanas y de *E. coli*, donde se observa una dependencia absoluta de polilisina para su fosforilación. En experimentos preliminares realizados en colaboración con el Dr Pinna (Italia), se ha encontrado que la subunidad catalítica α de la CK2 tiene la capacidad de fosforilar a la NDP quinasa de *C. albicans* en ausencia de subunidades β . El agregado de subunidades β en cantidades equimoleculares inhibe la actividad, la cual se restituye con el agregado de polilisina. La polilisina podría estar mimcando la unión de otras proteínas a la NDP quinasa. La NDP quinasa sería fosforilada sólo en presencia de otras proteínas específicas, probablemente con zonas de alta densidad de amino ácidos básicos.

Se realizaron estudios de cinética de defosforilación de distintas especies fosforiladas. Se determinó en un primer momento que la metodología fuera capaz de discriminar las fosforilaciones en serina/treonina de aquellas en histidina (**figura R-25.**). Se determinó luego que se podía detectar claramente la fosforilación en serina sobre la NDP quinasa de diversos orígenes, producto de la fosforilación por CK2 (**figura R-25. C**). Se demostró, entonces, que esta metodología cumple los requisitos necesarios para determinar la fosforilación *in vivo* de la NDP quinasa. A su vez, se demostró que bajo las condiciones de fosforilación por CK2 no se observa autofosforilación. Este efecto se debe en parte a la disminución de la autofosforilación bajo las condiciones de 10 mM Mg^{2+} , ClNa, y polilisina observadas para la NDP quinasa de *C. albicans* (**figura R-24.**); pero también se ve influido por el hecho que la fosforilación por CK2 determina una disminución de la capacidad de autofosforilación de la enzima, como se observa para la NDP quinasa A humana (**figura R-29.**).

La fosforilación *in vivo* de la NDP quinasa de *C. albicans* y humana pudo ser estudiada con el uso de la metodología mejorada y puesta a punto sobre membranas de Immobilon.

En ambos estudios, se determinó que se puede hallar el intermediario de la reacción (P)NDP quinasa. En el estudio realizado en células HeLa, además de las especies A y B autofosforiladas, se pudo identificar a la NDP quinasa B fosforilada en residuos de serina/treonina. Se encuentra en estudio si el sitio de fosforilación *in vivo* es el mismo del hallado *in vitro* por CK2.

La fosforilación *in vitro* de la NDP quinasa A por CK2 produjo la inhibición de su actividad enzimática, debido a la inhibición de la primera etapa de la reacción (autofosforilación). Esta propiedad sería fácilmente explicable si el sitio de fosforilación fuera la serina 120, ya que esta serina tiene una unión puente de hidrógeno con el residuo de ácido glutámico 130 (en la secuencia de *Dictyostelium*), indispensable para posicionar a la histidina reactiva (Tepper y col., 1994). El oxígeno γ de ésta serina se encuentra expuesto en la NDP quinasa B.

INTEGRACION GENERAL

A continuación se resumen algunos resultados salientes de este trabajo que serán utilizados, junto con los conocimientos previos, como base para la realización de un modelo tentativo de funcionamiento para las NDP quinasas.

1- La NDP quinasa se expresa en forma máxima durante el crecimiento logarítmico y mínimamente en fase estacionaria tardía, fenómeno que se manifiesta tanto por aumento de la Ae como por Western-blots. La actividad NDP quinasa aumentada durante el crecimiento logarítmico se correlaciona bien con la necesidad de mayor síntesis de nucleótidos trifosfatos para la síntesis de ADN y ARN, apoyando el rol tradicional a esta enzima: mantener el "pool" de NTPs.

En general hubo una buena correlación entre la Ae medida en los extractos durante el crecimiento y la cantidad de NDP quinasa detectada con anticuerpos. Sin embargo, en ciertos casos con crecimiento relativamente sincronizado se observó importantes aumentos de proteína sin el concomitante aumento en actividad. Este hecho permite suponer que la enzima podría estar inhibida en alguna etapa específica del ciclo celular.

2- A partir de los experimentos realizados sobre la enzima purificada, se determinó *in vitro* que ésta tiene como principales aceptores al GDP y al ADP (siendo sólo el GDP fisiológicamente significativo). Este hecho podría tener significación en relación a la hipótesis que postula un rol de la NDP quinasa asociada a proteínas que unen GTP.

3- Se describió la localización intracelular de la NDP quinasa. Se observó que dependiendo del tipo de ruptura de las células la enzima se encontró básicamente en la fracción soluble o, mediante rupturas más suaves, en una proporción mayor al 15% en membrana plasmática. No se encontraron cantidades significativas de NDP quinasa en la fracción nuclear, a juzgar por la medición de actividad enzimática.

Los resultados apoyan la hipótesis de un rol importante asociado a la membrana plasmática. En este punto cabe recordar que según Parks y Agarwal (1973), la actividad NDP quinasa intracelular es más de 10 veces mayor a la necesaria para la

síntesis de los NTPs celulares. Teniendo en cuenta este dato, la importancia potencial de la actividad asociada a membrana plasmática se visualiza más elocuentemente.

4- De acuerdo a los resultados obtenidos en cuanto a la fosforilación de las NDP quinasas., se abre la posibilidad que la NDP quinasa se encuentre fisiológicamente regulada por fosforilación.

Las evidencias que se presentan son las siguientes:

- a- Fosforilación *in vitro* de la NDP quinasa por la proteína quinasa CK2
- b- Fosforilación *in vivo* de la enzima
- c- Efecto inhibitorio de la fosforilación sobre la actividad enzimática

Si bien no se halló a la NDP quinasa de *C. albicans* fosforilada en serina *in vivo*, sería muy probable que no se hayan realizado los ensayos en las condiciones óptimas. Por el contrario, se propone que en aquellos casos durante el crecimiento donde se observó aumento de la cantidad de NDP quinasa sin aumentos en actividad, podrían ser debidos a la fosforilación *in vivo* de la enzima por CK2. Es interesante destacar que la NDP quinasa de *C. albicans* no cambia su movilidad electroforética por fosforilación por CK2.

Tomando estos datos en su conjunto, se puede concluir que tienden a apoyar (además de su función tradicional) un rol en la membrana plasmática, junto a proteínas que unen GTP, pero en una forma regulada por fosforilación. Hasta el momento, esta es la primera vez que se describe la regulación de la actividad de NDP quinasa por fosforilación por quinasas de proteínas. Como se describió, esta fosforilación inhibe la actividad enzimática a través de la inhibición de la autofosforilación de la enzima. La capacidad de autofosforilarse es también indispensable para que la enzima ejerza la actividad de proteína quinasa recientemente descrita (Engel y col., 1995; Wagner y Vu, 1995); se presupone, entonces, que la fosforilación por CK2 inhibiría este tipo de actividad también.

Como se detalló en la Introducción, se ha relacionado a la NDP quinasa con diversas funciones regulatorias: diferenciación celular, inhibición de metástasis,

transducción de señales así como factor de transcripción. Hasta el momento, no existe un modelo que combine y explique cómo interviene la NDP quinasa en los distintos procesos. En la literatura se ha descrito un único modelo de acción de las NDP quinasas en procesos regulatorios. Utilizando como soporte el modelo de acción de la NDP quinasa en la transducción de señales (Liotta y Steeg, 1990), a continuación éste se amplía con los conocimientos obtenidos respecto de la fosforilación.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

A partir de los resultados obtenidos, se expande el campo de posibilidades de estudio para la NDP quinasa, no sólo en *C. albicans*, sino también en otros sistemas. Sería interesante estudiar bajo qué estímulos se fosforila la NDP quinasa, o bien si su estado de fosforilación varía con el ciclo celular. Específicamente, se podrían diseñar experimentos para comprobar y completar el modelo de acción de la NDP quinasa en la transducción de señales.

En este sentido, para integrar la fosforilación a un sistema fisiológico de regulación, resta aún caracterizar a la fosfatasa específica que regula su acción.

Otras líneas de investigación podrían verificar si la fosforilación varía la capacidad de la NDP quinasa B humana de unir ADN. Relacionado con este tema, tal vez sea importante verificar si la fosforilación varía la facultad de la enzima de formar estructuras oligoméricas distintas del hexámero.

Respecto de la metodología mejorada para la discriminación de fosforilaciones en histidina, se podría plantear la detección y el clonado de NDP quinasas teniendo en cuenta los conocimientos sobre su autofosforilación en extractos crudos. A su vez, se podría extender esta metodología para el estudio de quinasas de histidina de organismos eucariotas.



REFERENCIAS

- Almaula, N., Lu, Q., Delgado, J., Belkin, S. y Inouye, M. (1995). Nucleoside diphosphate kinase from *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 177, 2524-2529.
- Allende, J.E. y Allende, C.C., (1995). Protein kinase CK2: an enzyme with multiple substrates and a puzzling regulation, *FASEB J.* 9, 313-323.
- Arcinas, M., y Boxer, L.M. (1994). Differential protein binding to the c-myc promoter during differentiation of hematopoietic cell lines, *Oncogene*, 9, 2699-2706.
- Avruch, J. and Wallach, D.F.H. (1971). Preparation and properties of plasma membrane and endoplasmic reticulum fragments from isolated rat fat cells, *Biochem. Biophys. Acta* 233, 334-347.
- Baba, H., Urano, T., Okada, K., Furukawa, K., Nakayama, E., Tanaka, H., Iwasaki, K., y Shiku, H. (1995). Two isotypes of murine nm23/nucleoside diphosphate kinase, nm23-M1 and nm23-M2, are involved in metastatic suppression of a murine melanoma line, *Cancer Res.* 55, 1977-1981.
- Bevilacqua, G., Sobel, M.E., Liotta, L.A., y Steeg, P.S. (1989). Association of low nm23 RNA levels in human primary infiltrating ductal breast carcinomas with lymph node involvement and other histopathological indicators of high metastatic potential, *Cancer Res.* 49, 5185-5190.
- Benn, J. and Schneider, R.J. (1994). Hepatitis B virus HBx protein activates Ras-GTP complex formation and establishes a Ras, Raf, MAP kinase signaling cascade, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 10350-10354.
- Berberich, S.J. y Postel, E.H. (1995). PuF/NM23-H2/NDPK-B transactivates a human c-myc promoter-CAT gene via a functional nuclease hypersensitive element, *Oncogene* 10, 2343-2347.
- Berg, P. y Joklik, W.K. (1953). Transphosphorylation between Nucleoside Polyphosphates, *Nature* 172, 1008-1009.
- Biggs, J., Tripoulas, N., Herperger, E., Dearolf, C., y Shearn, A. (1988). Analysis of the lethal interaction between the *prune* and *killer of prune* mutations of *Drosophila*, *Genes Dev.* 2, 1333-1343.
- Biggs, J., Hersperger, E., Steeg P.S., Liotta, L.A., y Shearn, A. (1990). A *Drosophila* gene that is homologous to a mammalian gene associated with tumor metastasis codes for a nucleoside diphosphate kinase, *Cell* 63, 933-940.
- Böhme, H.J., Kopperschaläger, G., Schultz, J. y Hofmann, E. (1972). Affinity chromatography of phosphofructokinase using Cibacron blue F3G-A, *J. Chromatogr.* 69, 209-214.

- Bominaar, A.A., Molijn, A.C., Pestel, M., Véron, M., y Van Haastert, P.J.M. (1993). Activation of G-proteins by receptor-stimulated nucleoside diphosphate kinase in *Dictyostelium*, *EMBO J.* 12, 2275-2279.
- Boldyreff, B., Meggio, F., Pinna, L.A. and Issinger, O.G. (1994). Efficient autophosphorylation and phosphorylation of the beta-subunit by casein kinase-2 require the integrity of an acidic cluster 50 residues downstream from the phosphoacceptor site, *J. Biol. Chem.* 269, 4827-4831.
- Bourdais, J., Biondi, R., Sarfati, S., Guerreiro, C., Iascu, I., Janin, J. y Véron, M. (1996). Cellular phosphorylation of anti-HIV nucleosides, *J. Biol. Chem.* 271, in press.
- Bücher, T. and Pfeleiderer, G. (1955). Pyruvate kinase from muscle, *Methods Enzymol.* 1, 435-440.
- Brunk, C.F., Jones, C.J. and James, W.T. (1979). Assay for nanogram quantities of DNA in cellular homogenates, *Anal. Biochem.* 92, 497-500.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brummel, M. and Soll, D.R. (1982). The temporal regulation of protein synthesis during synchronous bud or mycelium formation in the dimorphic yeast *Candida albicans*, *Develop. Biol.* 89, 211-224.
- Burns, R.G. y Islam, K. (1981). Nucleoside diphosphate kinase associates with rings but not with assembled microtubules, *Eur. J. Biochem.* 117, 515-519.
- Caligo, M.A., Cipollini, G., Fiore, L., Calvo, S., Basolo, F., Collecchi, P., Ciardiello, F., Pepe, S., Petrini, M. y Bevilacqua, G. (1995). Nm23 gene expression correlates with cell growth rate and S-phase, *Int. J. Cancer* 60, 837-842.
- Chambers, G.K. (1977). Determination of Cibacron Blue F3GA substitution in Blue Sephadex and Blue Dextran-Sepharose, *Anal. Biochem.* 83, 551-556.
- Cherlifs, J., Moréra, S., Iascu, I., Véron, M., y Janin (1994). X-ray structure of nucleoside diphosphate kinase complexed with dTDP and Mg^{2+} at 2 Å resolution, *Biochemistry* 33, 9061-9069.
- Chiadmi, M., Moréra, S., Iascu, I., Dumas, C., Le Bras, G., Véron, M., y Janin, J. (1994). Crystal structure of the Awd nucleotide diphosphate kinase from *Drosophila*, *Structure*, 1, 283-293.
- Cooney, M., Czernuszewicz, G., Postel, E.H., Flint, S.J. y Hogan, M.E. (1988). Site-specific oligonucleotide binding represses transcription of the human *c-myc* gene in vitro, *Science* 241, 456-459.

Dearolf, C.R., Tripoulas, N., Biggs, J., y Shearn, A. (1988). Molecular consequences of awd, a cell-autonomous lethal mutation of *Drosophila* induced by Hybrid dysgenesis, *Dev. Biol.* 129, 169-178.

Dearolf, C.R., Hersperger, E., y Shearn, A. (1988). Developmental consequences of awd, a cell autonomous lethal mutation of *Drosophila* induced by hybrid dysgenesis, *Dev. Biol.* 129, 159-168.

De Clercq, E. (1993). Antiviral agents: characteristic activity spectrum depending on the molecular target with which they interact, *Advances in Virus Research*, 42, 1-55.

De La Rosa, A., Williams, R.L., y Steeg, P.S. (1995). Nm23/nucleoside diphosphate kinase: toward a structural and biochemical understanding of its biological functions, *Bioessays* 17, 53-62.

De-Medina, T. y Shaul, Y. (1994). Functional and structural similarity between the X protein of hepatitis B virus and nucleoside diphosphate kinases, *FEBS Lett.* 351, 423-426.

De-Medina, T., Haviv, I., Noiman, S. y Shaul, Y. (1994). The X protein of hepatitis B virus has a ribo/deoxy ATPase activity, *Virology* 202, 401-407.

Dumas, C., Lebras, G., Wallet, V., Lacombe, M-L., Véron, M., y Janin, J. (1991). Chrystalization and preliminary X-ray diffraction studies of nucleoside diphosphate kinase from *Dictyostelium discoideum*, *J. Mol. Biol.* 217, 239-240.

Dumas, C., Lascu, I., Moréra, S., Glaser, P., Fourme, R., Wallet, V., Lacombe, M-L, Véron, M., y Janin, J. (1992). X-ray structure of nucleoside diphosphate kinase, *EMBO J.* 11, 3203-3208.

Egidy, G., Paveto, C., Passeron, S., y Galvagno, M.A. (1989). Relationship between cyclic adenosine 3'5'-monophosphate and germination in *Candida albicans*, *Exp. Mycol.* 13, 428-432.

Egidy, G., Paveto, C., Passeron, S., y Galvagno, M.A. (1990). cAMP levels and *in situ* measurement of cAMP related enzymes during yeast-to-hyphal transition in *Candida albicans*, *Exp. Mycol.* 13, 428-432.

Engel, M., Issinger, O-G., Lascu, I., Seib, T., Dooley, S., Zang, K.D., y Welter, C. (1994). Phosphorylation of nm23/nucleoside diphosphate kinase by Caseine Kinase 2 *in vitro*, *Bioch. Bioph. Res. Comm.* 199, 1041-1048.

Engel, M., Véron, M., Theisinger, B., Lacombe, M-L., Seib, T. Dooley, S. y Welter, C. (1995). A novel serine/threonine specific protein phosphotransferase activity of Nm23/nucleoside diphosphate kinase, *Eur. J. Biochem.* 234, 200-207.

Franklyn K.M. y Warmington, J.R. (1994). The expression of *Candida albicans* enolase is not heat shock inducible, *FEMS Microbiol. Lett.* 118, 219-226.

Fukuchi, T., Shimada, N., Hanai, N., Ishikawa, N., Watanabe, K. y Kimura, N. (1994). Recombinant rat nucleoside diphosphate kinase isoforms (α y β): purification, properties and application to immunological detection of native isoforms in rat tissues, *Biochem. Biophys. Acta* 1205, 113-122.

Garces, E., y Cleland, W.W. (1969). Kinetic studies of yeast nucleoside diphosphate kinase, *Biochemistry* 8, 633-641.

Gilles, A.M., Presecan, E., Vonica, A., y Lascu, I. (1991). Nucleoside diphosphate kinase from human erythrocytes. Structural characterization of the two polipeptide chains responsible for heterogeneity of the hexameric enzyme, *J. Biol. Chem.* 266, 8784-8789.

Gow, N.A.R., Robbins, P.W., Lester, J.W., Brown, A.J.P., Fonzi, W.A., Chapman, T. y Kinsman, O.S. (1994). A hyphal-specific chitin synthase gene (CHS2) is not essential for growth, dimorphism, or virulence of *Candida albicans*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 6216-6220.

Gimeno, C.J., Ljungdahl, O.P., Styles, C.A., y Fink, G.R. (1992). Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and Ras, *Cell* 68, 1067-1090.

Gupta Roy, B. y Datta, A. (1987). A calmoduline inhibitor blocks morphogenesis in *Candida albicans*, *FEMS Microbiol. Lett.* 41, 327-329.

Gupta, A., Mal, T. K., Jayasuruyan, N., y Chauhan, V., S. (1995). Assignment of disulphide bonds in the X protein (HBx) of Hepatitis B virus, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 212, 3, 919-924.

Hama, H., Almaula, N., Lerner, C., Inouye, S., Inouye, M. (1991). Nucleoside diphosphate kinase from *Escherichia coli*; its overproduction and sequence comparison with eucariotic enzymes, *Gene* 105, 31-36.

Haney, S.A. y Broach, J.R. (1994). Cdc25p, the guanine nucleotide exchange factor for the Ras proteins of *Saccharomyces cerevisiae*, promotes exchange by stabilizing Ras in a nucleotide-free state, *J. Biol. Chem.* 269, 16541-16548.

Hilderbrandt, M., Lacombe, M.L., Mesnildrey, S., y Véron, M. (1995). A human NDP kinase B specifically binds single-stranded poly-pyrimidine sequences, *Nucl. Acid Research* 23, 3858-3864.

Hubbard, M.J., Surarit, R., Sullivan, P.A., y Sepherd, M.G. (1986). The isolation of plasma membrane and characterization of the plasma membrane ATPase from the yeast *Candida albicans*, *Eur. J. Biochem.* 154, 375-381.

Izumiya, H., y Yamamoto, M. (1995). Cloning and functional analysis of the *ndk1* gene encoding nucleoside-diphosphate kinase in *Schizosaccharomyces pombe*, *J. Biol. Chem.* 270, 27859-27864.

Ji, L., Arcinas, M., y Boxer, L.M. (1995). The transcription factor, Nm23H2, binds to and activates the translocated *c-myc* allele in Burkitt's lymphoma, *J. Biol. Chem.* 270, 13392-13398.

Jong, A.Y. y Ma, J.J. (1991). *Saccharomyces cerevisiae* nucleoside-diphosphate kinase: purification, characterization, and substrate specificity, *Arch. Biochem. Biophys.* 291, 241-246.

Kamps, M. P. (1991). Determination of phosphoamino acid composition by acid hydrolysis of protein blotted to Immobilon, *Methods Enzymol.* 201, 21-27.

Kavanaugh-Black, A., Connolly, D.M., Chugani, S.A., y Chakrabarty, A.M. (1994). Characterization of nucleoside-diphosphate kinase from *Pseudomonas aeruginosa*: Complex formation with succinyl-CoA synthetase, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 5883-5887.

Keim, D., Hailat, N., Melhem, R., Zhu, X.X., Lascu, I., Véron, M. y Strahler, J. (1992). Proliferation-related expression of p19/nm23 nucleoside diphosphate kinase, *J. Clin. Invest.* 89, 919-924.

Kekulé, A. S., Lauer, U., Weiss, L., Lubet, B., y Hofschneider, P. A. (1993). Hepatitis B virus transactivator HBx uses a tumor promoter signalling pathway, *Nature* 361, 742-745.

Kikkawa, S., Takahashi, K., Takahashi, K.-i., Shimada, N., Ui, M., Kimura, N., y Katada, T. (1990). Conversion of GDP into GTP by nucleoside diphosphate kinase on GTP-binding proteins, *J. Biol. Chem.* 265, 21536-21540.

Kikkawa, S., Takahashi, K., Takahashi, K.-i., Shimada, N., Ui, M., Kimura, N., y Katada, T. (1990). Conversion of GDP into GTP by nucleoside diphosphate kinase on GTP-binding proteins: additions and corrections, *J. Biol. Chem.* 266, 12795.

Kimura, N. y Johnson, G.S. (1983). Increased membrane-associated nucleoside diphosphate kinase activity as a possible basis for enhanced guanine nucleotide dependent adenylate cyclase activity induced by picolinic acid treatment of simian virus 40-transformed normal rat kidney cells, *J. Biol. Chem.* 258, 12609-12617.

Kimura, N. y Shimada, N. (1988a). Direct interaction between membrane associated nucleoside diphosphate kinase and GTP-binding protein (Gs), and its regulation by hormones and guanine nucleotides, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 151, 248-256.

Kimura, N. y Shimada, N. (1988b). Membrane-associated nucleoside diphosphate kinase from Rat liver, *J. Biol. Chem.* 263, 4647-4653.

Kirsch, D.R. y Whitney, R.R. (1991). Pathogenicity of *Candida albicans* auxotrophic mutants in experimental infections, *Infect. Immun.* 59, 3297-3300.

Koike, K., Moriya, K., Iino, S., Yotsuyanagi, H., Endo, Y., Miyamura, T., y Kurokawa, K. (1994). High level expression of Hepatitis B virus HBx gene and Hepatocarcinogenesis en Transgenic Mice, *Hepatology* 19, 4, 810-819.

- Koyama, K., Yokoyama M., Koike, T., Ohtsuki, K. y Ishida, N. (1984). Nucleoside diphosphate kinase from Ehrlich ascites tumor cells, *J. Biochem.* 95, 925-935.
- Krebs, H.A., y Hems, R. (1953). Some reactions of adenosine and inosine phosphates in animal tissues, *Biochim. Biophys. Acta* 12, 172-180.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-685
- Lascu, I., Pop, R.D., Porumb, H., Presecan, E. y Proinov, I. (1983). Pig heart nucleoside diphosphate kinase. Phosphorylation and interaction with cibacron blue 3GA, *Eur. J. Biochem.* 135, 497-503.
- Lascu, I., Chaffotte, A., Limbourg-Bouchon, B., y Véron, M. (1992). A Pro/Ser substitution in nucleoside diphosphate kinase of *Drosophila melanogaster* (mutation killer of prune) affects stability but not catalytic efficiency of the enzyme, *J. Biol. Chem.* 268, 20268-20275.
- Laurent, T.C. y Killander, J. (1964). A theory of gel filtration and its experimental verification, *J. Chromat.* 14, 317-330.
- Lee, K.L., Buckley, H.R. y Campbell, C.C. (1975). An amino acid liquid synthetic medium for the development of mycelial and yeast forms of *Candida albicans*, *Sabouraudia* 13, 148-153.
- Leloir, L.F., Goldemberg, S.H. (1960). Synthesis of glycogen from uridine diphosphate glucose in rat liver, *J. Biol. Chem.* 235, 919-923.
- Leone, A., Flatow, U., Vanhoutte, K., Steeg, P.S. (1993). Transfection of human nm23-H1 into human MDA-MB-435 breast carcinoma cell line- affects on tumor potential, colonization and enzymatic activity, *Oncogene* 8, 9-13.
- Leone, A., Flatow, U., Richter-King, C., Sandeen, M.A., Margulies, I.M.K., Liotta, L.A. y Steeg, P.S. (1991). Reduced tumor incidence, metastatic potential and cytokine responsiveness of Nm-23 transfected melanoma cells, *Cell* 65, 25-35.
- Liotta, L.A., y Steeg, P.S. (1990). Clues to the function of Nm23 and Awd proteins in development, signal transduction, and tumor metastasis provided by studies of *Dictyostelium discoideum*, *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 1170-1172.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.L. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
- Liu, H., Köhler, J., y Fink, G.R. (1994). Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a STE12 homolog, *Science* 266, 1723-1725.
- MacDonald, N.J., De La Rosa, A., Benedict, M.A., Freije, J.M.P., Krutsch, H., y Steeg, P.S. (1993). A serine phosphorylation of Nm23, and not its nucleoside diphosphate

kinase activity, correlates with suppression of tumor metastasis potential, *J. Biol. Chem.* 268, 25780-25789.

Martin, R.G. y Ames, B.N. (1961). A method for determining the sedimentation behavior of enzymes: application to protein mixtures, *J. Biol. Chem.* 236, 1372-1379.

Martin, M.W., O'Sullivan, A.J. y Gomperts, B.D. (1995). Inhibition of cromoglycate and some flavonoids of nucleoside diphosphate kinase and of exocytosis from permeabilized mast cells, *British J. Pharmacol.* 115, 1080-1086.

Melki, R., Lascu, I., Carlier, M.F. y Véron, M. (1992). Nucleoside diphosphate kinase does not directly interact with tubulin nor microtubules, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 187, 65-72.

Moréra, S., Lascu, I., Dumas, C., LeBras, G., Briozzo, P., Véron, M., y Janin, M. (1994). Adenosine 5'diphosphate binding and the active site of nucleoside diphosphate kinase, *Biochemistry* 33, 459-467.

Moréra, S., Chiadmi, M., Lebras, G., Lascu, I. y Janin, J. (1995). Mechanism of phosphate transfer by nucleoside diphosphate kinase: X-ray structures of a phosphohistidine intermediate of the enzymes from *Drosophila* and *Dictyostelium*, *Biochemistry* 34, 12513-12523.

Moréra, S., Lacombe, M.L., Xu, Y.W., Lebras, G., y Janin, J. (1995). X-ray structure of human nucleoside diphosphate kinase B complexed with GDP at 2 angstrom resolution, *Structure* 3, 1307-1314.

Muñoz-Dorado, J., Inouye, S. y Inouye, M. (1990). Nucleoside diphosphate kinase from *Myxococcus xanthus*. II. Biochemical characterization, *J. Biol. Chem.* 265, 2707-2712.

Muñoz-Dorado, J., Almaula, N., Inouye, S., y Inouye, M. (1993). Autophosphorylation of nucleoside diphosphate kinase from *Myxococcus xanthus*, *J. Bacteriol.* 175, 1176-1181.

Nassal, M. and Schaller, H. (1993). Hepatitis B virus replication, *Trends Microbiol.* 1, 221-228.

Nickerson, J.A. y Wells, W.W. (1984). The microtubule-associated nucleoside diphosphate kinase, *J. Biol. Chem.* 259, 11297-11304.

Odds, F.C. (1988). *Candida* and Candidosis, 2nd edn, Bailliere Tindall, London

Ohtuski, K., Yokoyama, M., koike, T. y Ishida, N. (1984). Nucleoside diphosphate kinase in *Escherichia coli*: its polipeptide structure and reaction intermediate, *Biochem. Int.* 8, 715-723.

Ohtsuki, K., Ikeuchi, T. y Yokoyama, M. (1986). Characterization of nucleoside diphosphate kinase-associated guanine nucleotide-binding proteins from HeLa S3 cells, *Biochem. Biophys. Acta* 882, 322-330.

Ohtsuki, K., Yokoyama, M. y Uesaka, H. (1987). Physiological correlation between nucleoside diphosphate kinases and the 21-kDa guanine-nucleotide binding proteins copurified with the enzymes from the cell membrane fractions of Ehrlich ascites tumor cells, *Biochem. Biophys. Acta* 929, 231-238.

Okabe-Kado, J., Kasukabe, T., Honma, Y., Hayashi, M. y Hozumi, M. (1988). Purification of a factor inhibiting differentiation from conditioned medium of nondifferentiating mouse myeloid leukemia cells, *J. Biol. Chem.* 263, 10994-10999.

Okabe-Kado, J., Kasukabe, T., Honma, Hayashi, M., Henzel, W.J., y Hozumi, M. (1992). Identity of a differentiation inhibiting factor for mouse myeloid leukemia cells with Nm23/nucleoside diphosphate kinase, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 182, 987-994.

Okabe-Kado, J., Kasukabe, T., Hozumi, M., Honma, Y., Kimura, N., Baba, H., Urano, T. y Shiku, H. (1995). A new function of Nm23/NDP kinase as a differentiation inhibitory factor, which does not require its kinase activity, *FEBS Lett.* 363, 311-315.

Parks, R.E., Jr y Agarwal, R.P. (1973). Nucleoside diphosphokinases, en *The Enzymes* (Boyer, P.D., ed) Vol. 8, pp. 307-334, Academic Press, New York.

Paveto, C., Egidy, G., Galvagno, M.A., y Passeron, S. (1990). A guanine nucleotide-sensitive, glucagon-stimulated adenyl cyclase in *Candida albicans*: effect of glucagon on cell morphology, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 167, 1177-1183.

Paveto, C., Mallo, G., Egidy, G., Galvagno, M.A. and Passeron, S., (1991). Activation of the cAMP cascade by steroideogenic hormones and glucagon in the pathogenic fungus *Candida albicans*, *Cell Biol. Int. Rep.* 15, 169-178.

Paveto, C., Montero, L. and Passeron, S., (1992). Enzymatic and immunological detection of G protein α -subunits in the pathogenic fungus *Candida albicans*, *FEBS Lett.* 311, 51-54.

Pinna, L.A., (1990). Casein kinase 2: an "eminence grise" in cellular regulation?, *Biochem. Biophys. Acta* 1054, 267-284.

Postel, E.H., Mango, S.E., y Flint, S.J. (1989). A nuclease-hypersensitive element of the human *c-myc* promoter interacts with a transcription initiation factor, *Mol. Cell. Biol.* 9, 5123-5133.

Postel, E.H., Flint, S.J., Kessler, D.J., y Hogan, M.E. (1991). Evidence that a triplex-forming oligodeoxyribonucleotide binds to the *c-myc* promotor in HeLa cells, thereby reducing *c-myc* mRNA levels, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 8227-8231.

Postel, E.H., Beberich, S.J., Flint, S.J. y Ferrone, C.A. (1993). Human *c-myc* transcription factor PuF identified as nm23-H2 nucleoside diphosphate kinase, a candidate suppressor of tumor metastasis, *Science*, 261, 478-480.

Postel, E.H., Ferrone, C.A. (1994). Nucleoside diphosphate kinase enzyme activity of nm23-H2/PuF is not required for its DNA binding and *in vitro* transcriptional functions, *J. Biol. Chem.* 269, 8627-8630.

Presecan, E., Vonica, A. y Lascu, I. (1989). Nucleoside diphosphate kinase from human erythrocytes: purification, molecular mass and subunit structure, *FEBS Lett.* 250, 629-632.

Pulido-Cejudo, G., Slack, R., Hébert, R.L., y Proulx, P. (1995). Effect of retinoic acid on Nm/23 nucleoside diphosphate kinase and components of cyclic adenosine monophosphate-dependent signalling in human neuroblastoma cell lines, *Biochem. Biophys. Acta* 1266, 201-206.

Randazzo, P.A., Northup, J.K. y Kahn, R.A. (1991). Activation of a small GTP-binding protein by nucleoside diphosphate kinase, *Science* 254, 850-853.

Randazzo, P.A., Northup, J.K. y Kahn, R.A. (1992). Regulatory GTP-binding proteins (ADP-ribosylation factor, Gt, and Ras) are not activated directly by nucleoside diphosphate kinase, *J. Biol. Chem.* 267, 18182-18189.

Ratliff, R.L., Weaver, R.H., Lardy, H.A. y Kuby, S.A. (1963). Nucleoside triphosphate-nucleoside diphosphate transphosphorylase (nucleoside diphosphokinase). I. Isolation of the crystalline enzyme from brewers' yeast, *J. Biol. Chem.* 239, 301-309.

Rosengard, A. M., Krutzsch, H.C., Shearn, A., Biggs, J.R., Barker, E., Margulies, I.M.K., Ritcher-King, C., Liotta, L.A. y Steeg, P.S. (1989). Reduced Nm23/Awd protein in tumor metastasis and aberrant *Drosophila* development, *Nature* 342, 177-180.

Rubin, G.M. (1973). The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* 5.8 S ribosomal ribonucleic acid, *J. Biol. Chem.* 248, 3860-3875.

Schlichtman, D., Kavanaugh-Black, A., Shankar, S. y Chakrabarty, A.M. (1994). Energy metabolism and alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Role of the tricarboxylic acid cycle, *J. Bacteriol.* 176, 6023-6029.

Segel, I. H. (1975). Enzyme Kinetics. Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. A Wiley interscience publication, John Wiley & Sons, New York.

Siegel, M.L. y Monty, K. (1966). Determination of molecular weights and frictional ratios of proteins in impure systems by use of gel filtration and density gradient centrifugation: Application to crude preparations of sulfite and hydroxylamine reductase, *Biochem. Biophys. Acta* 291, 346-362.

Shepherd, M.G. (1985). Pathogenicity of morphological and auxotrophic mutants of *Candida albicans* in experimental infections, *Infect. Immun.* 50, 541-544.

Soll, D.R., y Bedell, G.W. (1978). Bud formation and the inducibility of pseudo-mycelium outgrowth during release from stationary phase in *Candida albicans*, *J. Gen. Microbiol.* 108, 173-180.

Soll, D.R. (1988). High frequency switching in *Candida albicans* and its relations to vaginal candidiasis, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 154, 997-1001.

Srere, P.A. (1969). Citrate synthase, *Methods Enzymol.* 13, 3-11.

Steeg, P.S. y Sobel, M.E. (1988). Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential, *J. Natl. Cancer Inst.* 80, 200-204.

Sturtevant, A.H. (1956). A highly specific complementary lethal system in *Drosophila melanogaster*, *Genetics* 41, 118-123.

Tepper, A.D., Dammann, H., Bominaar, A.A., y Véron, M. (1994). Investigation of the active site and conformational stability of nucleoside diphosphate kinase by site-directed mutagenesis, *J. Biol. Chem.* 269, 32175-32180.

Timmons, L., Xu, J., Hersperger, G., Deng, X-F., y Shearn, A. (1995). Point mutations in *awd kpn* which revert the *prune/killer of prune* lethal interaction affect conserved residues that are involved in nucleoside diphosphate kinase substrate binding and catalysis, *J. Biol. Chem.* 270, 23021-23030.

Tornevik, Y., Ullman, B., Balzarini, J., Wahren, B., y Eriksson, S. (1995). Citotoxicity of 3'-azido-3'-deoxyThymidine correlates with 3'-azido-5'-monophosphate (AZT-MP) levels whereas anti-human immunodeficiency virus (HIV) activity correlates with 3'-azido-Thymidine-5'-triphosphate (AZT-MP) levels in culture CMM T-Lymphoblastoid cells, *Biochem. Pharmacol.* 49, 829-837.

Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 4350-4354.

Troll, H., Winckler, T., Lascu, I., Müller, N., Saurin, W., Véron, M., y Mutzel, R. (1993). Separate nuclear genes encode cytosolic and mitochondrial nucleoside diphosphate kinase in *Dictyostelium discoideum*, *J. Biol. Chem.* 268, 25469-25475.

Ulloa, R.M., Muschietti, J.P., Véron, M., Torres, H.N. y Tellez-Iñón, M.T. (1995). Purification and characterization of a soluble nucleoside diphosphate kinase in *Trypanosoma cruzi*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 70, 119-129.

Van Rij, K.N.J.W. Ed. 1984 "The yeasts a taxonomic Study" 3ra Edición. Groningen The Netherlands, p 1082.

Venturelli, D., Martinez, R., Melotti, P., Casella, I., Peschle, C., Cucco, C., Spampinato, G., Darzynkiewicz, Z., y Calabretta, B. (1995). Overexpression of DR-nm23, a protein encoded by a member of the nm23 gene family, inhibits granulocyte differentiation and induces apoptosis in 32Dc13 myeloid cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 7435-7439.

Wagner, P.D. y Vu, N-D. (1995). Phosphorylation of ATP-citrate lyase by nucleoside diphosphate kinase, *J. Biol. Chem.* 270, 21758-21764.

Wallet, V., Mutzel, R., Troll, H., Barzu, O., Wurster, B., Véron, M., y Lacombe, M-L. (1990). *Dictyostelium* nucleoside diphosphate kinase highly homologous to Nm23 and Awd proteins involved in mammalian tumor metastasis and *Drosophila* development, *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 1199-1202.

Wieland, T. y Jakobs, K. (1992). Evidence for nucleoside diphosphate kinase-dependent channeling of guanosine 5'-(Thio)triphosphate to guanine nucleotide-binding proteins, *Mol. Pharmacol.* 42, 731-735.

Williams, R.L., Muñoz-Dorado, J., Jacobo-Molina, A., Inouye, S., Inouye, M., y Arnold, E. (1991). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of nucleoside diphosphate kinase from *Myxococcus xanthus*, *J. Mol. Biol.* 220, 5-7.

Williams, R.L., Oren, D.A., Muñoz-Dorado, J., Inouye, S., Inouye, M., y Arnold, E. (1993). Crystal structure of *Myxococcus xanthus* nucleoside diphosphate kinase and its interaction with a nucleotide substrate at 2.0 Å resolution, *J. Mol. Biol.* 234, 1230-1247.

Zerial, M. y Stenmark, H. (1993). Rab GTPases in vesicular transport, *Curr. Opin. Cell. Biol.* 5, 613-620.

Zhang, J., Nomura, T., Yatsunami, K., Honda, A., Sugimoto, Y., Moriwaki, T., Yamamoto, J., Ohta, Mitsuniko, Fukui, T. y Ichikawa, A. (1993). Nucleotide sequence of the cDNA encoding nucleoside diphosphate kinase II from spinach leaves, *Biochem. Biophys. Acta* 1171, 304-306.

Zhang, J., Fukui, T. y Ichikawa, A. (1995). A third type of nucleoside diphosphate kinase from spinach leaves: purification, characterization and amino-acid sequence, *Biochem. Biophys. Acta* 1248, 19-26.

Zinyk, D.L., McGonnigal, B.G. y Dearolf, C.R. (1993). *Drosophila* awd K-pn, a homologue of the metastasis suppressor gene-nm23, suppresses the *Tum-l* haematopoietic oncogene, *Nature genetics* 4, 2.